



REC'D 11 OCT 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

20 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

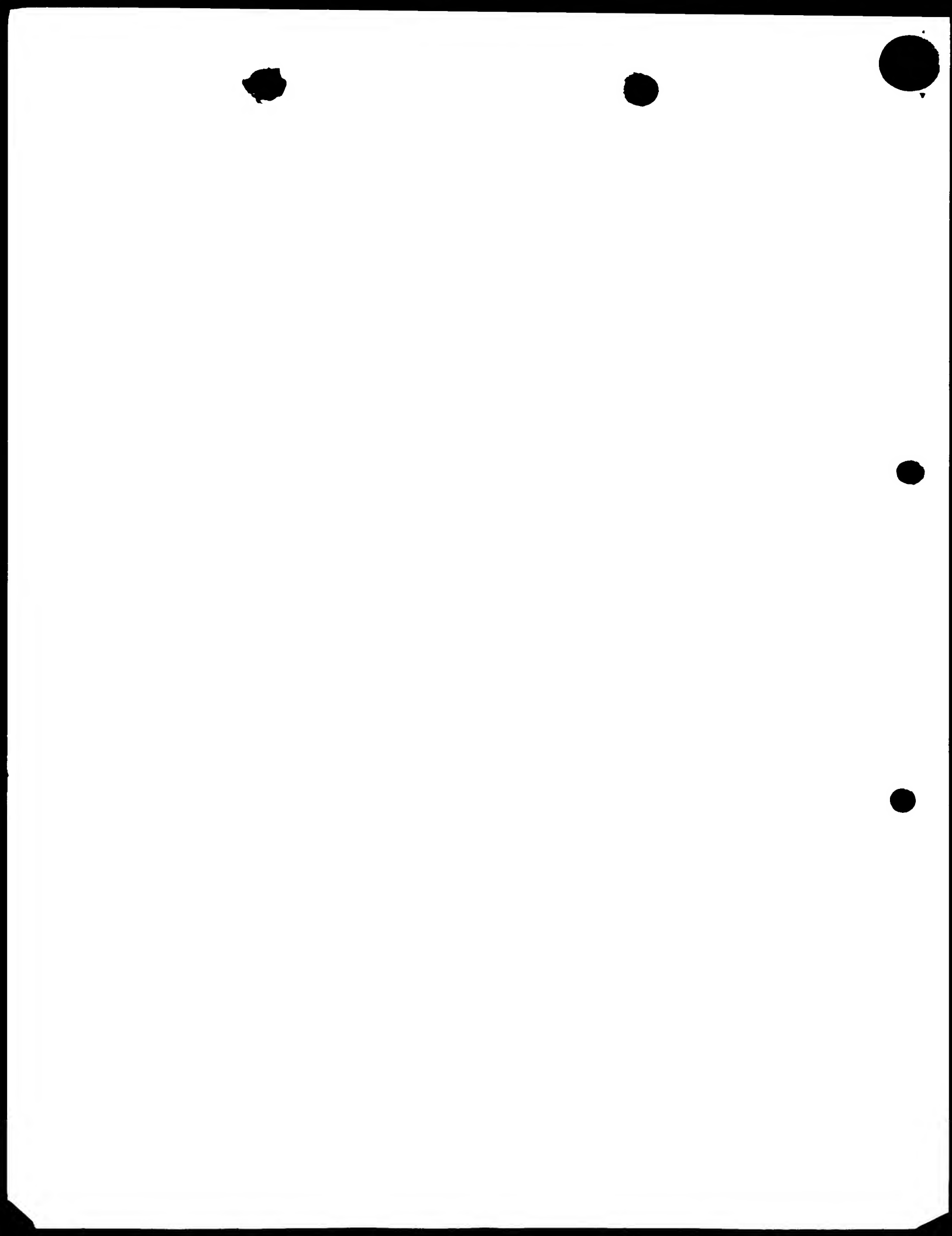
Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75400 PARIS Cedex 06
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 10





BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI



N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540a W/170299

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

17 SEPT 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9911678

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75 INPI PARIS

DATE DE DÉPÔT

17 SEP. 1999

AVENTIS PHARMA SA
Direction Brevets TRI LE1-144
20 av. Raymond Aron
92165- ANTONY cedex

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale

7485 (7.12.98)

ST 99040

01 55 71 69 22

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☒ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

NOUVEAU MODELE ANIMAL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER PRESENTANT A LA FOIS DES PLAQUES AMYLOIDES ET DES DYSFONCTIONNEMENTS MITOCHONDRIaux

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

3 . 0 . 4 . 4 . 6 . 3 . 2 . 8 . 4

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

AVENTIS PHARMA SA

Forme juridique

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

20 Avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(non requise du signataire)

Fondé de Pouvoir

LANCELOT Géraldine

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg ST 99040
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 11678

TITRE DE L'INVENTION :

NOUVEAU MODELE ANIMAL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER PRESENTANT A LA FOIS DES
PLAQUES AMYLOIDES ET DES DYSFONCTIONNEMENTS MITOCHONDRIAUX

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 Avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

MOUSSAOUI-MRABET Saliha - 166 Avenue Maréchal de Lattre de Tassigny
94120 FONTENAY SOUS BOIS

BLANCHARD-BREGEON Véronique - 73 rue Bobillot, 75013 PARIS

IMPERATO Assunta - 195 bis rue Raymond Losserand, 75014 PARIS

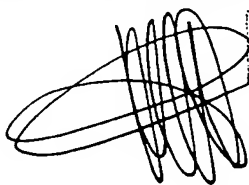
BONICI Bruno - 1 rue des Charmes, 91230 MONTGERON

TREMP Gunther - 6 Résidence du Parc d'Ardenay, 91120 PALAISEAU

CZECH Christian - 4 Cité de l'Alma, 75007 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire Antony, le 7 Décembre 1999



RHONÉ-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir

BOUVET Philippe

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
p 5, 7, 33				05.04.00	11 AVR. 2000 - V D
p. 47			X	05.04.00	AVR. 2000 - V D
planche 1 à 27 (photocopies)				05.04.00	11 AVR. 2000 - V D

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

NOUVEAU MODELE ANIMAL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER
PRESENTANT A LA FOIS DES PLAQUES AMYLOIDES ET DES
DYSFONCTIONNEMENTS MITOCHONDRIAUX

La présente invention concerne le domaine des modèles animaux transgéniques et
5 plus particulièrement, les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. L'invention se
rapporte à un nouveau modèle animal de la maladie d'Alzheimer présentant à la fois
des plaques amyloïdes et des dysfonctionnements mitochondriaux.

La maladie d'Alzheimer (AD) est une maladie neurodégénérative progressive qui
affecte une large proportion de la population âgée. Cette maladie est caractérisée sur
10 le plan clinique par une perte de la mémoire et un déclin des fonctions cognitives, sur
le plan neuropathologique par la présence dans le cerveau de dépôts neurofibrillaires
intracellulaires et de dépôts extracellulaires du peptide β -amyloïde ($A\beta$) formant les
plaques amyloïdes (Yanker et al., 1996). A ces signes s'ajoutent un nombre important
d'autres changements anormaux incluant une altération des systèmes immunitaires et
15 inflammatoires ainsi qu'une altération de la fonction mitochondriale pouvant conduire
à une augmentation du stress oxydatif, une activation des mécanismes de l'apoptose et
de manière ultime à la mort cellulaire.

Les plaques amyloïdes sont majoritairement composées des peptides $A\beta$ à 40 ou 42
résidus qui sont générés lors du processus protéolytique de la protéine précurseur du
20 peptide β -amyloïde (APP). Les dépôts extracellulaires de $A\beta$ sont très spécifiques de
l'AD et des désordres associés. Ils représentent la caractéristique précoce et invariable
de toutes les formes de l'AD, incluant les formes familiales (FAD). Les FAD
apparaissent de manière relativement précoce (entre 40 et 60 ans) et sont dues à des
mutations dans le gène de l'APP dans 5 % des cas de FAD (19 familles) avec six
25 mutations faux-sens simples ou doubles; dans le gène de la préséniline 1 (PS 1) dans
50 à 70 % des cas de FAD (> à 50 familles) avec plus de 40 mutations différentes
identifiées jusqu'à présent; et dans le gène de la préséniline 2 (PS 2) dans moins de
cas de FAD avec 2 mutations faux-sens décrites dans 8 familles (pour revue voir Price

et Sisodia, 1998). Des mutations dans ces trois gènes ont été démontrées comme induisant des changements dans la protéolyse de l'APP, qui conduisent à une surproduction de A- β et à l'apparition précoce de la pathologie et des symptômes qui sont similaires à ceux des formes sporadiques de l'AD.

- 5 En plus des mutations dans les gènes de l'APP, PS1 et PS2, d'autres facteurs contribuant à l'AD ont été mis en évidence chez l'homme, en particulier les dysfonctionnements de la mitochondrie (Beal, 1998). En effet, par différentes voies d'investigations chez des individus atteints par l'AD, il a été démontré que le dysfonctionnement mitochondrial était important dans l'apparition de la maladie.
- 10 En effet, selon une première approche, des déficiences de l'activité cytochrome C oxydase mitochondriale (COX ou complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale) ont été montrées dans le cerveau de sujets humain atteints par l'AD (Parker et al., 1989; Parker et al., 1994; Mutisya et al., 1994; Kish et al., 1992). Des mutations des gènes COX mitochondriaux ont également été mises en évidence dans
- 15 des formes tardives de l'AD. (Davis et al. 1996, 1997). Dans des cellules *cybrides* dans lesquelles les mitochondries des plaquettes de patients atteints par l'AD sont fusionnées à la lignée cellulaire SH-SY5Y caractérisée par une déplétion de son ADN mitochondrial, l'activité mitochondriale COX est diminuée de 52 %. Cette diminution de l'activité mitochondriale a pour conséquence une surproduction des radicaux libres
- 20 et une augmentation de la concentration basale de Ca^{2+} (Sheehan et al., 1997).

Dans une seconde approche, tout aussi importante, il a été démontré le rôle important du dysfonctionnement mitochondrial dans la mort cellulaire induite par apoptose chez des patients atteints par l'AD (Su et al., 1997; Mac Gibbon et al., 1997; Tortosa et al., 1998; Nagy et al., 1997), et en particulier le rôle important de Bax qui a été identifié

- 25 dans des lésions de patients AD (Bax étant une protéine mitochondriale de la famille de Bcl-2, connue pour induire la mort cellulaire par l'ouverture du "mégachannel" mitochondrial et la libération par la mitochondrie de molécules apoptotiques dans le cytosol incluant le cytochrome C, le substrat de COX, qui active les caspases, comme

cela a été démontré dans des cellules en cultures). En fait, Bax se concentre à la fois dans les éléments neuritiques entourant les plaques séniles (la localisation de bax est corrélée à celle des dépôts de A- β sur des sections adjacentes d'un même cerveau au niveau de l'hippocampe de sujet atteint par l'AD), et dans des neurones portant des
 5 dégénérescences neurofibrillaires précoces, indiquant que Bax joue un rôle dans la formation des dégénérescences neurofibrillaires chez les patients atteints par l'AD (MacGibbon et al., 1997; Tortosa et al., 1998; Nagy et al., 1997).

En ce qui concerne le A- β , il est clairement démontré dans la littérature que ses propriétés neurotoxiques montrées *in vitro* sont associées à la production de radicaux
 10 libres oxygénés (Pappola et al., 1998). Cette donnée semble cependant ne pas résoudre la question de savoir si le stress oxydatif est dû à un dysfonctionnement mitochondrial ou si le stress oxydatif apparaîtrait *in vivo* dans le cerveau en association avec les dépôts de A- β . En effet, les données, disponibles en grand nombre dans la littérature, montrant et/ou suggérant que la neurotoxicité de A- β est
 15 médiée par le stress oxydatif ne sont en fait que des données *in vitro* (et non *in vivo*). De plus, la toxicité de A- β *in vivo* a été mise en question dans de nombreux rapports (Papolla et al., 1998).

Tandis que dans le tissu cérébral humain, il est connu que les dépôts de A- β sont associés à un dysfonctionnement mitochondrial, aucune donnée n'a été rapportée à ce
 20 jour démontrant une association entre le dysfonctionnement mitochondrial et les dépôts de A- β dans un modèle animal transgénique de l'AD. Deux récentes publications sur les animaux transgéniques exprimant l'APP muté (animaux développés par Hsiao et al. 1996) rapportaient une augmentation de la superoxide dismutase (SOD) et de l'hème-oxygénase-1 (HO-1) et une augmentation de la
 25 peroxydation lipidique et de l'hydroxynonéal (HNE) en association avec des dépôts de A- β (Smith et al., 1998; Papolla et al., 1998). Cependant, tous ces marqueurs sont des marqueurs du stress oxydatif situés en aval du dysfonctionnement mitochondrial et ne sont pas spécifiques de ce dysfonctionnement. De plus, certains de ces marqueurs utilisés dans les études précédemment décrites, c'est-à-dire SOD et HO-1,

ne sont pas des oxydants induisant une mort neuronale mais sont par contre connus comme antioxydants impliqués dans les mécanismes de défense mis en jeu dans la réduction des dommages oxydatifs et de la mort cellulaire.

En ce qui concerne les présénilines, les mutations de PS1 ont été décrites comme induisant l'apoptose dans des cellules en culture et *in vivo* dans le cerveau de souris transgéniques exprimant PS1 mutée (Chiu et al., 1999). Cependant, cela ne démontre pas que l'apoptose induite par les mutations de PS1 est médiée par un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, l'apoptose peut être soit la conséquence d'un dysfonctionnement mitochondrial, soit la conséquence d'autres mécanismes de mort cellulaire non nécessairement impliqués dans le dysfonctionnement mitochondrial: par exemple, il a été démontré que l'inhibition de l'activité protéasique de l'enzyme de conversion de l'interleukine 1- β (ICE) prévient seulement des changements induits par Bax qui sont en aval de la mitochondrie (dégradation de l'ADN par exemple) mais n'a aucun effet sur les changements mitochondriaux tels que la perte du potentiel de membrane de la mitochondrie et la production de radicaux libres (Xiang et al., 1996). De récentes études *in vitro* ont montré que les mutations de PS1 sont impliquées dans la surproduction de radicaux libres, dans l'altération de l'homéostasie du calcium, et dans la perte du potentiel de membrane de la mitochondrie (Begley et al., 1999; Guo et al., 1996, 1997, 1998). Cependant, ces études ne montrent aucune association du dysfonctionnement mitochondrial avec les dépôts A- β chez des souris transgéniques exprimant PS1 mutée puisque les souris transgéniques utilisées dans ces études pour la préparation des synaptosomes ne développent pas de dépôts A- β . Il existe donc dans la littérature aucune évidence démontrant une association d'un dysfonctionnement mitochondrial et des dépôts A- β *in vivo*, dans le cerveau de souris transgéniques exprimant PS1 mutée (Chui et al., 1999) ou l'APP muté (Hsiao et al., 1996; Irizarry et al. 1997a, 1997b; Johnson-Wood et al. 1997) ou encore coexprimant l'APP muté et PS1 mutée (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998).

La présente invention résulte donc de la mise en évidence pour la première fois que les dépôts amyloïdes sont associés à des dysfonctionnements mitochondriaux *in vivo* dans le cerveau d'animaux transgéniques. En outre, l'invention résulte également de la recherche d'un nouveau modèle animal de l'AD plus représentatif et reproduisant la neuropathologie rencontrée chez l'homme.

Un premier objet de l'invention concerne donc un modèle animal transgénique de la maladie d'Alzheimer présentant à la fois des plaques amyloïdes et un dysfonctionnement mitochondrial.

On entend par animal transgénique tout animal non-humain présentant une modification de son génome. La modification du génome peut résulter d'une altération ou une modification de un ou plusieurs gènes par "knock-in" ou par "knock-out". Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques ou bien effectuée par mutagenèse dirigée, comme cela est décrit dans Matériels et Methodes.

La modification du génome peut également résulter d'une insertion de gène(s) ou de remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée.

Les modifications du génome sont avantageusement effectuées sur des cellules souches reproductrices et avantageusement sur les pronucléi.

Dans le cadre de la présente invention, le modèle animal est avantageusement un mammifère. En particulier il peut s'agir d'une souris, d'un rat ou d'un lapin obtenu selon les techniques classiques de transgénèse. A titre d'exemple illustrant l'un des procédés de transgénèse, on peut citer la méthode de microinjection d'une cassette d'expression comprenant les gènes modifiés dans les deux pronucléi fécondés, tel que cela est décrit dans Matériels et Méthodes.

A cet égard, le modèle animal de l'invention est obtenu par injection d'une cassette d'expression comprenant un acide nucléique. De manière préférentielle, cet acide

nucléique est un ADN qui peut être un ADN génomique (ADNg) ou un ADN complémentaire (ADNc).

- Dans le cadre du modèle de l'invention, l'ADN code pour tout gène pouvant intervenir dans le processus de mise en place de l'AD. A titre avantageux, le gène codé par l'ADN intervient dans le mécanisme de production du peptide A- β dans sa forme amyloïdogénique.

En particulier, l'ADN code pour des formes mutées de l'APP et/ou des présénilines et notamment pour la PS1 de sorte que les cellules du modèle animal coexpriment les deux protéines mutées.

- 10 Les mutations dans le gène de l'APP peuvent être l'une des différentes mutations décrites jusqu'à présent dans la littérature. De manière préférentielle, les mutations dans le gène de l'APP sont choisies parmi les mutations "Swedish" (S), "London" (L) et "Dutch" (D) seules ou en combinaison.

Ces mutations sont bien décrites dans la littérature et sont caractérisées d'une manière

- 15 générale par les modifications suivantes :

Nature et position	Mutation Swedish	Mutation Dutch	Mutation London
par rapport à l'APP770	K 670 N et M 671 L	E 693 Q et/ou A 692 G	V 717 I
par rapport à l'APP751	K 651 N et M 652 L	E 674 Q et/ou A 673 G	V 698 I
par rapport à l'APP695	K 595 N et M 596 L	E 618 Q et/ou A 617 G	V 642 I
par rapport au peptide A- β (A42)		E 22 Q et/ou A 21 G	V 46 I

Sont également comprises par mutation London toutes les substitutions autres que par l'isoleucine qui sont situées en position 717 par référence à l'APP770, telles que par exemple les mutations V 717 G et V 717 F.

Il est entendu que l'APP utilisable dans le cadre de l'invention, peut être sous
5 différentes isoformes et en particulier dans les formes 695, 751 et 770 ou dans une forme tronquée telle que par exemple l'isoforme APP99.

Les mutations dans le gène de PS1 peuvent être l'une des 40 mutations décrites jusqu'à présent dans la littérature. De manière préférentielle, les mutations dans le gène de PS1 sont choisies parmi les mutations M146L, A246E, C410Y, H163R,
10 L226V, L235P, etc..., seules ou en combinaison.

Pour la réalisation d'un modèle selon l'invention, la mutation M146L est préférée.

Dans le cadre du modèle de l'invention, l'ADN est placé sous le contrôle de séquences permettant son expression et en particulier de séquences promotrices de la transcription.

15 A titre de séquences promotrices, on peut citer tout particulièrement le promoteur HMG (Gautier et al., 1989), ainsi que le promoteur PDGF (Sasahan et al., 1991), le promoteur Thy-1 (Lüthi et al.,) et le promoteur du gène du Prion (Scott et al., 1992).

Selon une mise en œuvre particulièrement intéressante de l'invention, le modèle animal comprend le gène de l'APP ayant les mutations S, D et L, placé sous le
20 contrôle du promoteur PDGF et le gène de la PS1 ayant la mutation M146 L placé sous le contrôle du promoteur HMG.

Le modèle animal selon l'invention est très avantageux car il correspond à un modèle très représentatif de l'AD. En effet, ce modèle développe des plaques amyloïdes dès l'âge de 6 mois ce qui permet un temps d'élevage des animaux très court et coexprime
25 l'APP et PS1 mutées à des niveaux bien supérieurs aux niveaux endogènes; au moins

de 3 à 5 fois et de 2 à 3 fois les niveaux endogènes respectivement de l'APP et de PS1.

Ainsi, les résultats décrits dans les exemples démontrent que la souris transgénique coexprimant l'APP muté et la PS1 mutée, développe une neuropathologie de type
5 maladie d'Alzheimer; c'est-à-dire qu'elle présente des dépôts A- β avec une conformation fibrillaire, des changements neurodégénératifs de type éléments neuritiques anormaux et une activation des cellules centrales de type inflammatoire tels que les astrocytes.

De manière particulièrement intéressante, ce modèle présente, en plus des plaques
10 amyloïdes, un dysfonctionnement mitochondrial également mis en évidence chez des sujets atteints par l'AD.

Les résultats décrits dans les exemples démontrent l'implication d'un dysfonctionnement mitochondrial dans la neuropathologie de ces souris transgéniques AD. Comparativement aux données publiées jusqu'à maintenant dans les domaines de
15 la mitochondrie et de la maladie d'Alzheimer, ces résultats représentent la première démonstration, à travers l'étude de deux marqueurs importants de la mitochondrie, Bax et cytochrome C, qu'un dysfonctionnement mitochondrial se produit dans le cerveau des souris transgéniques AD de l'invention. Enfin, ces résultats montrent que de la même manière que dans le cerveau de patients AD, dans le cerveau de souris
20 transgénique AD, une expression de Bax et cytochrome C est produite dans des éléments neuritiques intimement associés aux dépôts A- β .

Dans la présente invention, le dysfonctionnement mitochondrial correspond à une altération, une modification, une surexpression ou une inhibition de l'expression des protéines mitochondriales. Ces protéines ayant préférentiellement une localisation
25 subcellulaire intramitochondriale incluent les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax, Bak, Bad et les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bcl-2 et Bcl-xL, ou tout autre protéine mitochondriale n'appartenant pas à la famille Bcl-2 et qui joue un rôle dans l'apoptose, comme à titre d'exemple

cytochrome C et AIF, ou encore des protéines récemment décrites comme étant localisées dans la mitochondrie et pouvant jouer un rôle dans l'apoptose comme Aralar ou BMCP1.

Préférentiellement, parmi les protéines mitochondriales dont l'expresssion est
5 modifiée on peut citer notamment les protéines Bax et/ou cytochrome C.

La présente invention est également relative à l'utilisation du modèle animal, tel que décrit précédemment, pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie d'Alzheimer.

En effet, par les propriétés avantageuses qui reproduisent très fidèlement les
10 caractéristiques de l'AD, ce modèle permet, en comparaison des modèles connus, la mise en évidence de composés particulièrement adaptés au traitement de l'AD, notamment, telle que décrite chez l'homme.

Ces composés peuvent être des molécules chimiques, des molécules peptidiques ou protéiques, des anticorps, des molécules chimériques ainsi que des ADNs antisens ou
15 des ribozymes.

Les composés mis en évidence peuvent être utilisés comme médicament, tels quels ou en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable afin d'obtenir une composition pharmaceutique. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou
20 magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les injections pouvant être réalisée par voie stéréotaxique, topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire,
25 transdermique, etc.

La mise en évidence des composés décrits précédemment repose sur la mise en contact, notamment par une administration telle que par exemple une injection, du modèle

animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effet(s) des composés notamment au niveau cérébral du modèle sur différents changements biochimiques et/ou histologiques comme par exemple ceux décrits dans les parties Méthodes et Résultats dont le taux
 5 de production des dépôts de A- β , les changements liés à la neurodégénérescence, l'altération de l'expression des molécules mitochondriales....

Un autre objet de l'invention concerne une cellule extraite du modèle animal tel que décrit précédemment ainsi que son utilisation pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie
 10 d'Alzheimer.

La mise en évidence de composés décrits précédemment repose sur la mise en contact de cellules extraites du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effet(s) des composés au niveau des cellules entières, dans des homogénats de cellules ou sur une
 15 fraction subcellulaire, sur différents paramètres tels que la mort cellulaire, la production du peptide A- β , l'activité mitochondriale (production de radicaux libres, chaîne respiratoire, potentiel mitochondrial, etc.).

Les résultats décrits dans les exemples démontrent les avantages du modèle de l'invention et supportent clairement l'utilisation de ce modèle transgénique pour le
 20 développement de stratégies thérapeutiques telles que notamment des agents mitochondriaux qui s'opposent au dysfonctionnement mitochondrial et à la mort neuronale induite par un dysfonctionnement mitochondrial.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent mais qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

25

LEGENDE DU TABLEAU I : tableau récapitulatif des résultats obtenus dans le modèle de souris double transgénique mettant en évidence des dépôts A- β et des

marqueurs de l'apoptose médiée par un dysfonctionnement mitochondrial dans des éléments neuritiques.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1

- 5 Comparaison des niveaux d'expression de l'APP, du fragment β -secrétase et de l'A- β chez différentes lignées de souris transgéniques.

Figure 2

- A: Analyse de l'expression de l'APP, du fragment 12kDa de la β -secrétase et de l'A- β dans des homogénats de cerveaux de souris transgéniques à différents âges porteuses d'une simple ou double mutation, via l'utilisation de l'anticorps WO-2
10 dirigé spécifiquement contre la forme humaine de l'A- β . L'âge des souris transgéniques ne modifie pas le niveau d'expression de l'APP mais conduit à une forte accumulation de l'A- β .

B: Analyse de l'expression de PS1 M146L humaine.

15 Figure 3

- Planche illustrative de l'expression de l'APP humaine dans l'hippocampe et le cortex de souris transgéniques porteuses d'une simple (mutant APP) (b1,b2) ou d'une double mutation (mutant APP/PS1) (c1,c2). A noter le niveau d'expression élevé de l'APP dans les neurones hippocampaux (b1, c1) et corticaux (b2,c2) de ces deux lignées de
20 souris transgéniques et le niveau d'expression très faible voire indétectable de l'APP dans les régions cérébrales correspondantes des animaux contrôles non transgéniques (a1,a2). De la même façon, l'expression de la PS1 humaine au sein des mêmes régions cérébrales est présente chez les souris transgéniques porteuses d'une simple (mutant PS1) (e1,e2) ou d'une double mutation (mutant APP/PS1) (f1, f2) et est indétectable
25 chez les animaux contrôles non transgéniques (d1, d2).

Figures 4 et 5

Illustration des dépôts A- β dans le cerveau des souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) âgées de 6 mois (Fig. 4) et 12 mois (Fig. 5). Détection immunohistochimique avec plusieurs anticorps dirigés spécifiquement contre des épitopes différents du peptide A- β : anticorps 6E10 pour A β ₁₋₁₇, Dako pour A β ₈₋₁₇, 4G8 pour A β ₁₇₋₂₄, QCB pour A β ₁₋₄₂ and FCA18 pour A β total.

Figure 6

Images représentatives des histologies Thioflavine S et Rouge Congo (colorations verte et rouge, respectivement) au niveau de la formation hippocampale chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) âgées de 12 mois. Démonstration de la conformation fibrillaire des dépôts A- β dans le cerveau de ces souris. A noter la morphologie variable des dépôts A- β ; de forme sphérique (flèches) ou irrégulière (têtes de flèches) chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1).

Figure 7

Progression des dépôts A- β immunomarqués avec l'anticorps anti-A β 4G8 chez la souris transgénique porteuse d'une double mutation (mutant APP/PS1). A noter la densité des dépôts A- β beaucoup plus forte à 12 mois d'âge (C1, C2, C3) comparativement à 9 et 6 mois d'âge (B1, B2, B3 et A1, A2, A3, respectivement). A noter également que les dépôts A- β sont essentiellement localisés dans une région cérébrale restreinte, principalement le subiculum chez la souris jeune (A1-A2), tandis qu'ils sont présents dans l'ensemble de la formation hippocampale et des régions corticales chez la souris âgée de 12 mois (C1 -C2). Les figures A2, B2, C2 et A3, B3, C3 représentent un plus fort grossissement des régions délimitées par un cadre noir dans les figures A1, B1, C1 et des figures A2, B2, C2, respectivement. Hi: hippocampus, Ctx: cortex.

Figure 8

Nombre de dépôts A- β en fonction de l'âge (6, 9 et 12 mois) immunomarqués avec l'anticorps anti-A β 4G8 et quantifiés, sur des coupes d'hémicerveau de 6 μ m d'épaisseur (niveau rostrocaudal Bregma -3,4 de l'Atlas Stéréotaxique de Franklin et Paxinos), via l'utilisation d'un système d'analyse d'images couplé à une caméra couleur et un microscope (Q600, LEICA) chez la souris double transgénique APP₆₉₅ SDL X PS1 M146 L.

Figure 9

Distribution régionale des dépôts A- β dans le cerveau d'une souris transgénique porteuse d'une double mutation (mutant APP/PS1) âgée de 12 mois. L'immunomarquage avec l'Ac anti-A β 4G8 a été réalisé sur des coupes de 25 μ m correspondants à 6 niveaux représentatifs de l'axe rostrocaudal du cerveau de souris. A noter le nombre très élevé de dépôts A- β dans la formation hippocampale et l'ensemble des régions corticales.

Figure 10

Quantification chez toutes les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) âgées de 12 mois de la charge en A- β visualisée par immunohistochimie A β (Ac 4G8) sur coupes d'hémicerveau de 25 μ m d'épaisseur (niveau rostrocaudal Bregma -3,4). A noter la charge en A- β qui atteint plus de 3 et 1% de la surface totale de l'hippocampe et du cortex, respectivement, et plus de 9 et 5% dans les régions les plus riches de ces deux structures cérébrales. La charge en A- β est en revanche inférieure à 0,5% dans les régions sous-corticales.

1 : Cortex dorsal comprenant notamment le cortex primaire visuel et le cortex auditif

2 : Cortex ventral comprenant notamment le cortex ectorhinal et le cortex entorhinal

25 3 : Formation hippocampale

4 : Reste d'hémicerveau (structures subcorticales)

Figure 11

Images représentatives de la présence d'éléments neuritiques APP-immunoréactifs (têtes de flèches en 4) dans l'hippocampe des souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) et de leur absence dans l'hippocampe des souris contrôles non transgéniques et des souris transgéniques porteuses d'une simple mutation APP (mutant APP) ou PS1 (mutant PS1). Chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1), les éléments neuritiques APP-immunoréactifs sont également présents dans toutes les régions corticales, incluant le cortex entorhinal (a) et le cortex cingulaire (d), dans le gyrus denté et dans les régions hippocampales CA1 et CA3 (b,c). Les régions délimitées par un cadre noir sur les figures b, b1 et b3 sont visualisées à plus fort grossissement en b1, en b2 et b3, et en b4, respectivement. A noter également le niveau d'expression très élevé de la protéine APP humaine dans certains corps cellulaires neuronaux (flèches en b2). La flèche en 1, 2, 3 et 4 indique l'orientation de la tête du gyrus denté.

Figure 12

Images représentatives de la présence d'éléments neuritiques PS1-immunoréactifs (têtes de flèches en 4) dans l'hippocampe des souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) et de leur absence dans l'hippocampe des souris contrôles non transgéniques et des souris transgéniques porteuses d'une simple mutation APP (mutant APP) ou PS1 (mutant PS1). Chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1), les éléments neuritiques PS1-immunoréactifs sont également présents dans toutes les régions corticales, incluant le cortex entorhinal (a) et le cortex cingulaire (d), dans le gyrus denté et dans les régions hippocampales CA1 et CA3 (b,c,e). Les régions délimitées par un cadre noir sur les figures c, d et e sont visualisées à plus fort grossissement en c', en d' et en e', respectivement. A noter également le niveau d'expression très élevé de la protéine PS1 humaine dans certains corps cellulaires neuronaux en e' et d' (flèches).

Figure 13

Images représentatives de la présence d'éléments neuritiques delta caténine-immunoréactifs dans l'hippocampe (Hi) et le cortex (Ctx) des souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) (b1, b2) et de leur absence dans les mêmes structures cérébrales chez les souris contrôles non transgéniques (a1, a2). Les régions délimitées par un cadre noir sur les figures b1 et b2 sont visualisées à plus fort grossissement en b1a, b1b et en b2a, b2b, respectivement. A noter que, de même que les éléments neuritiques APP- et PS1-immunoréactifs, les éléments neuritiques delta caténine-immunoréactifs apparaissent groupés en plaques de taille variable, petite, moyenne ou grande.

Figure 14

Eléments neuritiques synaptophysine-immunoréactifs chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) et chez l'homme atteint de AD. A noter que, dans les deux cas, sur coupes de cerveau doublement immunomarquées, les éléments neuritiques synaptophysine-immunoréactifs (immunomarquage brun) entourent fortement les dépôts A- β (immunomarquage bleu).

Figure 15

Neurofilaments phosphorylés SMI-immunoréactifs chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) et chez l'homme atteint de AD. A noter que, dans les deux cas, sur coupes de cerveau doublement immunomarquées, les neurofilaments phosphorylés SMI-immunoréactifs (immunomarquage brun) entourent fortement les dépôts A- β (immunomarquage bleu).

Figure 16

Immunoréactivité *tau-1* (immunomarquage brun) concentrée dans des éléments neuritiques incluant des neurites dystrophiques localisés autour ou à l'intérieur des dépôts A- β (immunomarquage bleu) et des corps cellulaires neuronaux (têtes de

flèches) dans le cerveau des souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). Ni neurites dystrophiques, ni corps cellulaires immunoréactifs pour la protéine *tau-1* ne sont présents chez les souris contrôles non transgéniques.

Figure 17

- 5 Astrocytes activés GFAP-immunoréactifs (immunomarquage brun) présents chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1) et chez l'homme atteint de AD. A noter que, dans les deux cas, sur coupes de cerveau doublement immunomarquées, les astrocytes activés entourent certains dépôts A- β (immunomarquage bleu).

10 Figure 18A

- Images représentatives de l'expression Bax dans les neurones du gyrus denté, des régions hippocampales CA1 et CA3 et du cortex entorhinal d'une souris contrôle non transgénique et d'une souris transgénique porteuse d'une double mutation (mutant APP/PS1). A noter que des éléments neuritiques Bax-immunoréactifs (têtes de
15 flèches) sont présents chez la souris double transgénique tandis qu'ils sont absents chez la souris contrôle non transgénique.

Figure 18B

- Images représentatives d'un double immunomarquage permettant de visualiser l'expression de Bax (en brun) et les dépôts A- β (en bleu) sur une même coupe de
20 gyrus denté et de la région hippocampale CA3 de souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). A noter que l'immunoréactivité Bax est concentrée dans des éléments neuritiques anormaux tels que des neurites dystrophiques intimement associés aux dépôts A- β (flèches). L'immunoréactivité Bax est également concentrée dans certains corps cellulaires anormaux qui apparaissent
25 fortement immunomarqués au niveau de leur cytoplasme périnucléaire et qui ressemblent aux neurones dits « sombres » (têtes de flèches noires). Elle apparaît

également dans certaines cellules gliales qui rappellent les astrocytes activés (têtes de flèches blanches).

Figure 18C (voir légende de la figure 18B)

- Autre illustration d'un double immunomarquage permettant de visualiser l'expression de Bax (en brun) et les dépôts A- β (en bleu) sur une même coupe de cerveau de souris transgénique porteuse d'une double mutation (mutant APP/PSI). Pour les flèches et têtes de flèches voir la légende de la figure 18B.

Figure 18D

- Démonstration de la spécificité de l'immunomarquage Bax par des expériences d'absorption impliquant l'incubation d'un peptide Bax synthétique avec l'anticorps (Ac) anti-Bax dilué avant son application sur des coupes de cerveau de souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PSI). Le peptide Bax synthétique inhibe l'immunomarquage Bax de manière significative (mais partielle) à la concentration de 0,02 mg/ml tandis qu'il l'inhibe complètement à la concentration de 0.2 mg/ml.

Figure 19

- Éléments neuritiques Bax-immunoréactifs dans le cortex frontal d'un sujet humain contrôle et d'un sujet atteint de AD. A noter, chez le sujet AD et non chez le contrôle, la présence d'éléments neuritiques Bax-immunoréactifs (immunomarquage brun) tels que des neurites dystrophiques (flèches) dont certains apparaissent intimement liés aux dépôts A- β (immunomarquage bleu) et des corps cellulaires anormaux présentant des zones de marquage très intenses dans le cytoplasme et les prolongements proximaux ressemblant ainsi à des dégénérescences neurofibrillaires (têtes de flèches).

Figure 20A

a,b: Images représentatives de l'expression du cytochrome C dans la région hippocampale CA1 des souris contrôles non transgéniques et des souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). A noter la présence d'éléments
 5 neuritiques cytochrome C-immunoréactifs (flèches) chez la souris double transgénique et leur absence chez la souris contrôle non transgénique.

c,d,e,f,g,h: images représentatives d'un double immunomarquage permettant de visualiser l'expression du cytochrome C (en brun) et les dépôts A- β (en bleu) sur une même coupe de gyrus denté, des régions hippocampales CA1 et CA3 et du cortex
 10 cingulaire de souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). A noter que l'immunoréactivité cytochrome C est concentrée dans des éléments neuritiques anormaux tels que des neurites dystrophiques intimement associés aux dépôts A- β (flèches en b, c, d, e, f). L'immunoréactivité cytochrome C est également concentrée dans certains corps cellulaires anormaux qui apparaissent fortement
 15 immunomarkés au niveaux de leur cytoplasme périnucléaire (têtes de flèches en c, d, f). Les images à fort grossissement en g et h montrent l'association intime des éléments cellulaires cytochrome C-immunoréactifs avec les dépôts A- β (flèches en g, h).

Figure 20B

20 Démonstration de la spécificité de l'immunomarquage cytochrome C par des expériences d'absorption impliquant l'incubation d'une protéine cytochrome C purifiée de cheval ou de rat avec l'anticorps anti-cytochrome C dilué avant son application sur des coupes de cerveau de souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). Les deux protéines cytochrome C de cheval et
 25 de rat inhibent l'immunomarquage cytochrome C de manière significative (mais partielle) à la concentration de 0,01 mg/ml tandis qu'elles l'inhibent complètement à la concentration de 0,1 mg/ml.

Figure 21

Eléments neuritiques cytochrome C-immunoréactifs dans le cortex frontal d'un sujet humain contrôle et d'un sujet atteint de AD. A noter la présence, chez le sujet AD et non chez le contrôle, d'éléments neuritiques cytochrome C-immunoréactifs (immunomarquage brun) tels que des neurites dystrophiques (flèches) dont certains apparaissent intimement liés aux dépôts A- β (immunomarquage bleu) et des corps cellulaires anormaux présentant des zones de marquage très intense dans le cytoplasme et dans les prolongements proximaux ressemblant ainsi à des dégénérescences neurofibrillaires (têtes de flèches).

Figure 22

Double marquage immunofluorescent permettant de visualiser l'expression de Bax par fluorescence rhodamine en rouge (a1, b1, c1) et l'expression de l'APP, PS1 ou SMI par fluorescence fluorescéine en vert (a2, b2, c2, respectivement) sur la même coupe de cerveau de souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). A noter la présence de Bax et APP, de Bax et PS1 au sein des mêmes éléments neuronaux (colocalisation dans les mêmes neurones et plaques), et pour contrôle, la colocalisation des immunofluorescences Bax et SMI à l'intérieur ou autour des plaques et non dans les corps cellulaires. Le double marquage immunofluorescent en d1 et d2 montre la colocalisation du cytochrome C avec la delta caténine dans un nombre important d'éléments neuronaux (mais pas dans tous) dans le cerveau des souris doublement transgéniques. Les images e1 et e2 montrent le double marquage immunofluorescent de Bax et APP et leur colocalisation dans les éléments neuritiques à l'intérieur ou autour des plaques dans le tissu cérébral chez l'homme atteint de AD.

Figure 23

Double marquage immunofluorescent permettant de visualiser l'expression de Bax par fluorescence CY3 en rouge et l'expression de l'APP, PS1 ou cytochrome C par

fluorescence fluorescéine en vert sur la même coupe de cerveau de souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). Confirmation de la colocalisation de Bax et APP, de Bax et PS1 et de Bax et cytochrome C.

5

A/ Matériels et Méthodes

1. Mutagénèse de PS1

La mutagénèse de PS1 humaine a été faite via l'utilisation d'un système de mutagénèse *in vitro*, le SculptorTM (Amersham, France). La région codante de PS1, incluant un motif consensus Kozak, a été sous-clonée dans le vecteur Bluescript (Stratagène) et les mutations ont été introduites selon le protocole fourni par le fabricant via l'utilisation d'oligonucléotides contenant la mutation désirée. Les séquences mutées ont été vérifiées par analyse de séquence.

2 Génération et identification des souris transgéniques PS1 M146L

Pour la construction du transgène, le cDNA codant pour la PS1 mutée humaine a été sous-clonée entre les sites de restriction SmaI et BamHI du polylinker du vecteur d'expression transgénique HMG (Czech et al., 1997). Pour la microinjection, les séquences du vecteur ont été éliminées par restriction avec l'enzyme NotI et purification du fragment contenant la cassette d'expression par gel d'électrophorèse. Le fragment purifié a été dilué à la concentration finale de 2.5 ng/μl dans du Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) EDTA 0.1 mM, et injecté dans un des deux pronucléi des embryons fertilisés de souris. Les embryons survivants ont été immédiatement transplantés dans l'oviducte de mères adoptrices (pseudopregnant). La présence du transgène chez les nouveaux nés a été déterminée soit par PCR soit par une analyse en Southern. La PCR a été réalisée avec des oligomères correspondant à la PS1 humaine (5'-TAA TTG GTC CAT AAA AGG C- 3'; 5'-GCA CAG AAA GGG AGT CAC AAG-3') amplifiant un fragment de 550 bp. Pour le Southern-blot, un fragment 1.2-kb PstI -

SallI du premier intron de la cassette d'expression de HMG, radiomarké avec l'alphaP-32- dCTP, a servi de sonde pour la détection du transgène et du gène HMG endogène, comme contrôle interne. Par l'ensemble de ces analyses, tout réarrangement majeur ou délétions du transgène dans les fondateurs et leur
5 descendance peuvent être exclus.

3 Construction des vecteurs d'expression du transgène pour l'APP

3.1 PDGF APP₆₉₅SDL

Le plasmide contenant la cassette d'expression du promoteur PDGF a été linéarisé via l'endonucléase de restriction *Sna* *BI* selon les procédures standards (Ausubel et al. ;
10 Current Protocols in Mol. Biol.) pour générer une coupure à bouts francs afin de sous-cloner l'ADNc de APP.

La mutagénèse de l'APP a été décrite précédemment (Czech et al. 1997). L'ADNc codant pour l'APP₆₉₅SDL humaine a été excisé du plasmide de clonage à l'aide des endonucléases de restriction *Sma*I and *Cla*I. Les extrémités cohésives générées par
15 *Cla*I ont été rendues à bout franc en traitant à l'aide du fragment de Klenow de l'ADN polymérase. L'identité et l'intégrité de la construction PDGF APP₆₉₅SDL a été vérifiée par analyse du patron de restriction et les jonctions entre les fragments de DNA fusionnés ont été contrôlées par séquençage partiel.

Un kit de préparation de plasmide (Qiagen) a été utilisé pour préparer du DNA
20 superenroulé. Le transgène complet a été purifié comme décrit ci-dessus par digestion via l'enzyme de restriction *Not*I et séparation du fragment transgène par électrophorèse. Les aliquots destinés à la microinjection ont été dialysés contre un tampon TE (10 mM Tris pH 7.4 ; 0.1 mM EDTA) sur un filtre flottant (Millipore ; type de membrane : VS ; 0.025 µm) puis filtrés (Spin-X ; Costar ; membrane poly-
25 acétate ; 0.22 µm). Le DNA a été dilué à la concentration finale de 1 - 2 ng/ µl pour la microinjection.

3.2 APP₇₅₁SDL

La mutagenèse de l'APP a été décrite précédemment (Czech et al. 1997) et les séquences de l'APP mutées ont été introduites dans le cDNA APP₇₅₁ par insertion du fragment APP Sma I/Bgl II contenant l'exon 8 dans le vecteur Bluescript contenant les mutations. Pour générer la construction d'expression transgénique APP₇₅₁SDL Thy-1, le cDNA APP, du site Sma I (-95) au site Cla I (2699) a été cloné dans un vecteur pBluescript modifié contenant des sites Sal I de part et d'autre du site d'insertion. Le vecteur a été digéré avec Sal I et l'insert cloné dans le vecteur Thy-1 murin en utilisant le site Xho I (Lüthi et al. J Neuroscience 17, 4688-4699).

10 L'orientation correcte a été vérifiée par analyse de restriction et la construction séquencée aux sites de ligation. Pour la microinjection, la cassette a été linéarisée par restriction Not I-Pvu I puis purification du fragment contenant le transgène.

3.3 APP₇₅₁Kozak SL

La mutagenèse de l'APP a été décrite précédemment (Czech et al. 1997) et les séquences APP mutées ont été introduites dans le cDNA APP₇₅₁ par insertion du fragment APP Sma I/Bgl II avec l'exon 8 dans le vecteur Bluescript contenant les mutations. Pour optimiser le site d'initiation de traduction de l'APP, une séquence consensus Kozak optimisée a été introduite par mutagenèse dirigée par PCR. Pour la PCR, la combinaison d'oligonucléotides était: oligo sense (region d'initiation): ccc ggg tcc acc atg ctg ccc ggt ttg g (séquence Kozak sous-lignée), oligo antisense: ttc agg gta gac ttc ttg gc. Le produit de la PCR a été cloné dans pCR2 (Invitrogen, France), séquencé puis sous-cloné dans le vecteur Bluescript contenant le cDNA APP₇₅₁SL utilisant Sma I and Acc I, délétant ainsi le 5' UTR de l'APP et introduisant la séquence consensus Kozak. Pour générer la construction transgénique APP₇₅₁ Kozak SL Thy-1, le cDNA APP ci-dessus, étendu en 3' to Cla I (2699), a été sous-cloné en vecteur Bluescript modifié contenant deux sites Sal I de part et d'autre de l'insert. Le vecteur a été digéré avec Sal I et l'insert cloné dans le vecteur Thy-1 murin en utilisant le site Xho I (Lüthi et al. J Neuroscience 17, 4688-4699). L'orientation

correcte a été vérifiée par analyse de restriction et la construction séquencée aux sites de ligation. Pour la microinjection, la cassette a été linéarisée par restriction Not I–Pvu I puis purification du fragment contenant le transgène.

3.4 Génération des animaux transgéniques

- 5 Les animaux transgéniques ont été obtenus et identifiés selon des procédures standard déjà décrites (e.g. « Manipulating the Mouse Embryo » ; Hogan et al CSH Press ; Cold Spring Harbor. N.Y.).

4 Analyse par Western blot

- 10 Le tissu cérébral de souris transgéniques et de souris contrôles non transgéniques (littermate) a été homogénéisé sur de la glace dans une solution de sucrose 0.32 M contenant des inhibiteurs de protéase (CompleteTM, Boehringer-Mannheim, Allemagne). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 4°C pendant 5 min à 1500g. La concentration en protéine dans le surnageant a été mesuré à l'aide du test de protéine BCA (Pierce, USA). Pour la détection de PS1, 25 µg d'extrait
- 15 protéique ont été incubés à 56°C pendant 20 min dans du tampon de dépôt Laemmli contenant de l'urée 8mM et du dithiothreitol 50 mM. Pour la détection de l'APP et de l'A-β, 25µg d'extrait protéique ont été dénaturés à 95°C pendant 10 min dans 30 µl du tampon standard de dépôt Laemmli. Les protéines ont été fractionnées par électrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE). Après transfert des protéines sur
- 20 filtre de nitrocellulose (Amersham, France), le filtre a été chauffé dans du PBS pendant 5 min afin d'augmenter la sensibilité et immédiatement saturé avec 5% (w/V) de lait écrémé en poudre dans du TBST 850mM Tris-HCl pH 8.1, 150 mM NaCl, 0.05% (V/V) Tween 20 pendant 1h et incubé la nuit à 4°C avec l'Ac primaire en tampon TBST seul. La liaison de l'Ac a été détecté avec un Ac-anti IgG conjugué à la
- 25 peroxidase de Raifort (Amersham, France) suivi d'un système de détection par chemiluminescence (Amersham, France) selon les instructions du fabricant. Pour la détection de PS1, l'Ac primaire MAB1563 (Chemicon, USA) a été utilisé à la dilution

1/10000 ; pour la détection de l'APP et l'A- β , l'anticorps WO-2 a été utilisé à la concentration 0,1 μ g/ml.

5 Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie

Les anticorps (Ac) primaires qui ont été utilisés sont les suivants :

- 5 Ac monoclonal de souris anti-APP (1:100 ; 22C11, Boehringer)
- Ac monoclonal biotinylé de souris anti-A β ₁₇₋₂₄ (1:200, clone 4G8, Senetek)
- Ac monoclonal biotinylé de souris anti-A β ₁₋₁₇ (1:200, clone 6E10, Senetek)
- Ac monoclonal de souris anti-A β ₈₋₁₇ (1:100, clone 6F/3D, Dako)
- Ac polyclonal de lapin anti-A β ₁₋₄₂ (1:300, QCB)
- 10 Ac polyclonal de lapin anti-A β _{total} (1:1000, FCA18 de Checler)
- Ac monoclonal de rat anti-PS1 (1:50, Chemicon)
- Ac polyclonal de lapin anti-delta caténine (1:2000, RPR)
- Ac polyclonal de lapin anti-GFAP (1:3000, Dako)
- Ac polyclonal de lapin anti-synaptophysine (1:100, Dako)
- 15 Ac monoclonal de souris anti-neurofilaments phosphorylés (PNF) (SMI 312, 1:100, Sternberger)
- Ac monoclonal de souris anti-*Tau-1* (*Tau*, protéine associée aux microtubules) (5 μ g/ml, Boehringer Mannheim)
- Ac polyclonal de lapin anti-Bax (P19, 1:300, Santa Cruz)
- 20 Ac monoclonal de souris anti-cytochrome C (clone 7H8.2C12, 1:200, Pharmingen)

Les anticorps secondaires (1:400, Vector) qui ont été utilisés sont des Ac anti-IgG de souris (H + L) pour les expériences impliquant l'utilisation d'Ac primaires de souris, et des Ac anti-IgG de lapin ou des anti-IgG de rat (H + L) pour les expériences impliquant l'utilisation d'Ac primaires de lapin ou de rat, respectivement. Dans certaines expériences de marquage immunofluorescent, l'Ac secondaire qui a été utilisé est un anti-IgG de lapin conjugué au fluorochrome CY3 (1/400, Vector),

6 Manipulation des animaux

Les animaux ont été hébergés dans des conditions de température et humidité contrôlées et soumis à un cycle de 12h de jour/ 12 heures de nuit (lumière 7 :00 EST). Les animaux avaient libre accès à l'alimentation et à l'eau. Les expérimentations sur ces animaux ont été réalisées avec l'accord du Comité d'Ethique de Rhône Poulenc Rorer sur le soin et l'utilisation des animaux, en conformité avec les standards du « Guide for the care and use of laboratory animals » (National Research Council ILAR) et dans le respect des règlements françaises et de la directive CEE.

Les animaux utilisés pour les études neurohistopathologiques sont listés dans le tableau suivant:

	Souris non transgéniques (littermate)					Souris simple transgéniques PDGF APP ₆₉₅ SDL					Souris simple transgéniques HMG PS1M146L					Souris double transgéniques PDGF APP ₆₉₅ SDL X HMGPS1M146L			
Age (mois)	6	9	12	15	18	6	9	12	15	18	6	9	12	15	18	6	9	12	15
Nombre	1	5	4	6	2	4	2	2	4	-	1	2	9	5	7	4	5	5	-

7 Neurohistopathologie

7.1 Préparation du tissu cérébral

- Les souris ont été profondément anesthésiées (Pentobarbital: 60 mg/ml/kg i.p.,
 5 Kétamine: 40 mg/ml/kg i.p.) puis perfusées en transcardiaque avec du sérum physiologique puis du paraformaldéhyde (4% dans du PBS). Les cerveaux ont été ensuite prélevés puis postfixés dans la même solution de fixation 24h à 4°C. Après la fixation, les cerveaux ont été séparés en hémicerveaux droit et gauche puis soumis au protocole classique d'enrobage dans la paraffine.
- 10 Les hémicerveaux gauches enrobés dans la paraffine des souris transgéniques et non transgéniques, et également des blocs de tissu de cerveau humain postmortem (cortex frontal) d'un sujet atteint de AD et d'un sujet contrôle (fournis par Dr J.P. Brion, Belgique), ont été coupés à 6 μ m d'épaisseur (coupes sériées), via l'utilisation d'un microtome (LEICA RM 2155, France). Les blocs de tissu correspondants aux
 15 hémicerveaux droits des souris transgéniques et non transgéniques ont été coupés à une épaisseur de 25 μ m.

- Pour chaque expérience d'immunohistochimie, les coupes de cerveaux ont d'abord été déparaffinées avec du xylène et déshydratées dans de l'éthanol 100 %. Les coupes ont ensuite été incubées dans de l'H202 (1% dans du méthanol) afin de bloquer les
 20 activités peroxidasiques endogènes, rincées dans de l'éthanol et du tampon citrate (10 Mm citrate de sodium, pH 6) et finalement placées dans un micro-ondes (650W, Whirlpool) pendant 2x 5 min dans la solution de citrate. Pour les expériences d'immunomarquage de la protéine A- β , les coupes ont été soumises à une étape supplémentaire, une incubation de 3 min dans l'acide formique à 80%.

25

7.2. Thioflavine S

Les coupes ont été colorées avec la thioflavine S 1% (Sigma, France) après avoir été incubées 10 min dans une solution d'hématoxyline de Mayer (Sigma, France) pour bloquer la fluorescence nucléaire. Elles ont ensuite été observées au microscope

équipé d'un système de fluorescence (Axioscop Zeiss, France) via l'utilisation d'un filtre FITC.

7.3. Rouge Congo

- 5 Les coupes colorées au Rouge Congo (Kit de coloration de l'amyloïde, Accustain, Sigma, France) ont été analysées via un système de lumière polarisée. Seuls les dépôts rouges biréfringents (à la rotation du polariseur) ont été considérés comme des dépôts Congo rouge-positifs.

10 7.4. Marquage immunoenzymatique

- Après une incubation de 30 min dans du tampon de blocage (sérum normal de chèvre (Chemicon) à 10% dans du PBS contenant 0,1% de triton (Sigma)), les coupes de cerveaux déparaffinées ont été incubées dans la solution d'Ac primaire (toute la nuit à 4°C). Après rinçages, les coupes ont été mises en présence de l'Ac secondaire biotinylé (pendant 2h à température ambiante) puis en présence du complexe avidin-biotin peroxidase selon les instructions du fabricant (Kit ABC Vectastin, Laboratoires Vector, Burlingame, CA). La 3-3'-diaminobenzidine a été utilisée comme chromogène pour l'enzyme peroxidase.

- 20 Pour les expériences de préabsorption, l'Ac anti-Bax (anticorps P19, Santa Cruz) a été incubé avec le peptide synthétique Bax (Contrôle peptide P19, Santa Cruz) (concentrations du peptide testées: 0,002, 0,02 et 0,2 mg/ml) pendant au moins 12 h avant d'être utilisé selon le protocole d'immunohistochimie décrit précédemment. L'Ac anti-cytochrome C (7H8.2C12, Pharmingen) a été incubé selon le même protocole avec du cytochrome C purifié exogène de coeur de cheval ou de rat (Sigma)
- 25 (concentrations des protéines purifiées testées: 0,01 et 0,1 mg/ml).

7.5. Quantification de la charge en amyloïde

- La déposition en A- β a été quantifiée sur des coupes d'hémicerveaux de 25 μ m A β -immunomarquées (Ac monoclonal de souris biotinylé anti-A β ₁₇₋₂₄, 4G8, Senetek) via
- 30 l'utilisation de la diaminobenzidine comme chromogène et d'un système d'analyse

d'images couplé à une caméra couleur et à un microscope (Système Q600, LEICA). Des images vidéo de chaque région anatomique d'intérêt ont été capturées et un seuil de détection automatique du niveau de gris moyen correspondant à l'immunomarquage des dépôts A- β (et capable de discriminer le marquage spécifique du bruit de fond) a été défini. Un contrôle manuel de chaque champs a été effectué par l'expérimentateur afin d'éliminer manuellement tout artefact. Pour chaque souris, la charge en A- β a été mesurée au niveau rostrocaudal bregma -3,4 de l'atlas stéréotaxique de souris (Franklin et Paxinos). La charge en A- β est définie comme le pourcentage de la surface de l'immunomarquage A- β par rapport à la surface totale de la région cérébrale analysée, c'est-à-dire l'hippocampe, le cortex et le reste de la coupe (régions sous corticales).

7.6. Double marquage immunoenzymatique

Les expériences de double marquage immunohistochimique ont été réalisées par incubation des coupes de cerveau selon un protocole à deux étapes. Brièvement, les coupes ont été immunomarcuées dans une première étape via l'utilisation d'un Ac primaire (par exemple: anti-GFAP, anti-synaptophysine, anti-Bax ou anti-cytochrome C) visualisé par un marquage brun via l'utilisation de la diaminobenzidine (substrat enzymatique de la peroxidase de Raifort) selon le protocole décrit précédemment. Les mêmes coupes ont été ensuite immunomarcuées via l'utilisation de l'Ac primaire anti-A β ₁₇₋₂₄ (Ac monoclonal de souris, 4G8, Senetek) visualisé par un marquage bleu via l'utilisation du substrat SG de la peroxidase de Raifort (Kit Substrat SG de la peroxidase, Vector).

7.7. Double marquage immunofluorescent

Dans certaines expériences, un double marquage immunofluorescent a été réalisé en particulier dans le but de démontrer si Bax colocalise avec APP, PS1, cytochrome C ou SMI dans des éléments neuritiques associés aux dépôts A- β chez les souris transgéniques porteuses d'une double mutation (mutant APP/PS1). Brièvement, les coupes ont d'abord été incubées dans l'Ac anti-Bax et révélées soit via l'utilisation

- d'un Ac secondaire biotinylé anti-IgG de lapin conjugué au CY3 (1:400, Chemicon), soit via l'utilisation d'un Ac secondaire anti-IgG de lapin puis d'un kit d'amplification du signal (Complexe streptavidine-peroxidase /tétraméthyl-Rhodamide Tyramide) selon les instructions du fabricant (New England Nuclear). Pour le second marquage
- 5 immunofluorescent, les coupes ont été incubées successivement avec un Ac primaire anti-APP, anti-PSI, anti-cytochrome C ou anti-SMI puis un Ac secondaire biotinylé anti-IgG de souris ou de rat. Les coupes ont été finalement révélées via l'utilisation d'un second système d'amplification du signal (Complexe streptavidine-peroxidase / Fluorescéine Tyramide) selon les instructions du fabricant (New England Nuclear).
- 10 Les observations microscopiques des coupes ont été réalisées via l'utilisation des filtres CY3 ou rhodamine (excitation à 550 nm, émission à 570 nm) pour le marquage immunofluorescent Bax et du filtre fluorescéine (excitation à 495 nm, émission à 517nm) pour le deuxième marquage immunofluorescent. De la même manière, pour
- 15 démontrer si le cytochrome C colocalise avec la protéine delta caténine, les coupes ont été dans un premier temps incubées dans l'Ac anti-cytochrome C et révélées via le système de fluorescence Rhodamine. Dans une deuxième étape ces mêmes coupes ont été incubées dans l'Ac anti-delta caténine et révélées via le système de fluorescence Fluorescéine comme décrit ci-dessus.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Analyse des niveaux d'expression du transgène

5 1.1 Comparaison des niveaux d'expression du transgène dans différentes souris transgéniques exprimant l'APP mutée

Les homogénats de cerveau de différentes lignées de souris transgéniques (différentes constructions d'expression) ont été analysés par Western blot pour l'expression de l'APP, via l'utilisation d'un anticorps monoclonal WO-2. Cet anticorps est

10 spécialement indiqué car il reconnaît l'APP et l'A- β humaines mais ne reconnaît pas l'APP endogène de souris. Aucun signal n'a été en effet détecté dans la piste correspondant à la souris non transgénique (Fig. 1, piste 3). Les pistes 1 et 2 de la figure 1 correspondent aux extraits de cerveaux de souris transgéniques précédemment montrées exprimant des niveaux élevés du transgène APP (Moechard et al.1999a).

15 Les souris transgéniques PDGF APP₆₉₅SDL dans la piste 7 ont été utilisées pour produire des lignées de souris doubles transgéniques avec les souris porteuses du transgène PS1 M146L. Un niveau modéré de l'expression de l'APP est visible chez les souris avec le promoteur HMG dans la construction (Czech et al. 1997). A noter que chez les souris transgéniques pour la forme mutation suédoise de l'APP, le fragment

20 bêta-sécrétase (12 KDa) est augmenté relativement à l'holoprotéine APP complète.

1.2 Analyse par Western blot de l'expression et du processing du transgène dans le cerveau de souris double transgéniques APP et Présénilines.

Afin de savoir si l'expression de chaque transgène individuel était modifié dans les

25 souris portant les deux transgènes (obtenues par croisement), des homogénats de cerveaux de souris double transgéniques à différents âges ont été analysés par Western blot pour l'expression de l'APP et de l'A- β via l'utilisation de l'anticorps monoclonal WO-2 (décrit ci-dessus). Aucune différence d'intensité des bandes correspondant à la séquence complète de l'APP à 110kDa et au fragment amino

30 terminal de 12 kDa n'est visible entre la souris PDGF-APP₆₉₅SDL

(monotransgéniques) et les souris double transgéniques APP₆₉₅SDL x PS1M146L (Fig 2A, comparer aussi avec la piste 7, Fig.1). De plus, l'âge des souris transgéniques n'influence pas l'expression du transgène APP ni son métabolisme au niveau du site de clivage bêta. Néanmoins, il y a une forte accumulation de l'A- β à 9 mois et
 5 débutant à l'âge de 6 mois. Cette augmentation de l'A- β est bien corrélée avec le début de la formation des plaques amyloïdes dans le cerveau des souris transgéniques (voir ci-dessous). Ceci suggère que l'augmentation de l'A- β détectée par western blot peut correspondre à l'A- β accumulée dans les plaques amyloïdes.

Une autre analyse par Western blot sur homogénats de cerveaux a été réalisée afin de
 10 déterminer si la protéine PS1 humaine est exprimée chez les souris double transgéniques et chez les souris contrôles (littermate) non transgéniques. Un Ac monoclonal dirigé contre la partie amino-terminale de PS1 a été utilisé. Cet Ac est spécifique pour la PS1 humaine; aucun signal de la protéine PS1 endogène n'est détecté dans l'homogénat cérébral de la souris APP simple mutante (Fig. 2B, pistes 1,
 15 2). Le fragment PS1 amino-terminal caractéristique est détecté dans le cerveau de la souris exprimant PS1M146L (Fig. 2B, pistes 3-7) avec l'apparition de l'holoprotéine complète (approx. 51 kDa) PS1M146L vraisemblablement due à la saturation du processing des présénilines, comme cela a été décrit précédemment chez le rat et la souris transgéniques exprimant des quantités élevées de PS1 (Czech et al., 1998;
 20 Thinakaran et al., 1996). L'expression et le processing de la PS1 humaine chez la souris double transgénique ne varient pas avec l'âge de l'animal.

En conclusion, les niveaux d'expression des transgènes individuels (APP ou PS1) sont similaires dans les souris mono et double transgéniques.

25 **EXEMPLE 2 : Localisation et expression régionale des transgènes chez les souris simple (PDGF APP₆₉₅SDL ou HMG PS1M146L) ou double (PDGF APP₆₉₅SDLx HMG PS1M146L).**

Les expériences d'immunohistochimie de l'APP, utilisant l'Ac monoclonal de souris dirigé contre la protéine APP (Ac 22C11), ont montré que les souris simple (PDGF
 30 APP₆₉₅SDL) et double (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L) transgéniques

expriment plus fortement la protéine APP que les souris contrôles non transgéniques (Fig. 3). Ce résultat confirme que ces deux lignées de souris transgéniques expriment la protéine APP humaine codée par le transgène APP₆₉₅SDL. L'APP humaine est localisée exclusivement dans les neurones. Son pattern d'expression est similaire dans
 5 les deux lignées de souris transgéniques et concerne de nombreuses structures cérébrales; le niveau d'expression le plus élevé étant observé dans les couches neuronales de la formation hippocampale (Fig. 3), suivi d'une expression homogène dans les régions corticales tel que le cortex entorhinal et dans l'amygdala. Les régions sous-corticales montrent un niveau d'expression plus faible du transgène et la protéine
 10 APP humaine n'est pas détectée ni dans les cellules gliales ni au niveau vasculaire.

De la même manière, les expériences d'immunohistochimie de PS1, utilisant l'Ac monoclonal de rat dirigé contre la protéine PS1 humaine (Ac qui reconnaît spécifiquement la PS1 humaine), ont montré que les souris simple (HMG PS1
 15 M146L) et double (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L) transgéniques expriment la protéine PS1 humaine dans le cerveau avec une localisation spécifique dans les neurones (Fig. 3), bien que certaines cellules gliales immunomarquées soient occasionnellement observées. Le pattern d'expression de la protéine PS1 humaine est similaire dans les deux lignées de souris transgéniques. Son niveau d'expression est
 20 élevé dans les structures corticales telles que la formation hippocampale (Fig. 3) et différentes régions du cortex et aussi dans les régions sous-corticales. Elle n'est pas exprimée dans la substance blanche. A la fois pour la protéine APP humaine et pour la protéine PS1 humaine, ni le pattern ni le niveau d'expression ne changent avec l'âge (de 6 à 12 mois).

25

EXEMPLE 3 . Mise en évidence d'un processus accéléré de déposition de l'amyloïde dans le cerveau des souris double transgéniques porteuses à la fois de la protéine APP mutante et de la protéine PS1 mutante (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L)

Afin de démontrer si les différents modèles de souris transgéniques générés développent des dépôts A- β dans le cerveau, nous avons utilisé à la fois différents Ac anti-A β (voir Matériel et Méthodes) et des marqueurs histologiques classiques (Thioflavine S et Rouge Congo) connus pour colorer les dépôts A- β dans le tissu humain de sujets atteints de AD.

En utilisant l'ensemble de ces marqueurs des dépôts A- β , nous avons démontré qu'aucune des souris simple transgéniques, PDGF APP₆₉₅SDL ou HMG PS1M146L, ne présente de déposition d'amyloïde dans le cerveau aux âges 3, 6, 9, 12 et 15 mois. En revanche, les souris double transgéniques PDGF APP₆₉₅SDL x HMGPS1M146L présentent des dépôts A- β dès l'âge de 6 mois. L'existence d'un tel processus de déposition de la protéine amyloïde est démontrée avec les différents Ac anti-A β utilisés (Fig. 4 et 5). Ces dépôts A- β sont également colorés par la Thioflavine S et le Rouge Congo, confirmant ainsi leur conformation fibrillaire (Fig.6).

15 **EXEMPLE 4 : Progression et pattern régional de la déposition de l'amyloïde chez les souris double transgéniques (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L)**

Dans le but d'évaluer la progression et le pattern de distribution régionale de la déposition de l'amyloïde résultant de l'expression du transgène chez les souris doubles transgéniques (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L), le nombre de dépôts A- β sur des coupes d'hémicerveau de 6 μ m d'épaisseur à différents âges et la charge en amyloïde sur des coupes de 25 μ m d'épaisseur à l'âge de 12 mois ont été quantifiés via l'utilisation de l'Ac anti-A β 4G8. Pour la quantification de la charge en amyloïde, nous nous sommes focalisés sur le cortex et l'hippocampe car ce sont deux structures cérébrales impliquées de manière précoce et prédominante dans la neuropathologie chez les souris transgéniques et chez l'homme atteint de AD.

Le nombre de dépôts A- β est plus élevé chez les souris à 12 mois que chez les souris âgées de 6 et 9 mois, comme le montre de manière qualitative et quantitative les

figures 7 et 8, respectivement. Les dépôts A- β , à 6 et 9 mois, sont localisés dans une région cérébrale restreinte correspondant au subiculum et à la portion dorsale de la région hippocampale CA1 (Fig.7). En revanche, à 12 mois, les dépôts A- β plus nombreux sont localisés dans l'ensemble des régions hippocampales et corticales tout le long de l'axe rostrocaudal du cerveau (Fig. 7 et Fig. 9). Chez les souris âgées de 12 mois, les dépôts A- β sont présents seulement occasionnellement dans certaines structures sous-corticales (par exemple, la capsule interne, le thalamus dorsolatéral et les ganglions de la base). Ils ne sont présents ni dans le cervelet, ni dans la moelle épinière. L'analyse quantitative de la charge en amyloïde chez les souris âgées de 12 mois (Fig. 10) montre que les pourcentages de la surface de l'immunomarquage A β par rapport à la surface totale de la région analysée atteignent des valeurs de 3,1; de 0,8 à 1,1 et <0,5 pour l'hippocampe, le cortex et le reste de l'hémicerveau, respectivement. La charge en amyloïde atteint plus de 9% et 5% dans les champs les plus riches de l'hippocampe et du cortex, respectivement. De telles charges en amyloïde sont situées dans un ordre de valeur similaire à celui décrits précédemment dans le cerveau humain AD (6-12%) (Hyman et al., 1993).

EXEMPLE 5 : Eléments neuritiques chez la souris double transgénique (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L)

Dans toutes les souris transgéniques qui développent des dépôts A- β , les dépôts de grande et moyenne tailles contiennent de nombreux éléments neuritiques, comme le montrent d'une part les images de simples immunomarquages avec différents marqueurs des neurites dystrophiques telles que l'APP (Fig. 11), la PS1 (Fig. 12) et la delta caténine (Fig.13) et d'autre part les images de doubles immunomarquages, qui permettent de visualiser, sur une même coupe de cerveau, les dépôts A- β avec l'Ac anti-A β 4G8 et les éléments neuritiques avec l'Ac anti-synaptophysine ou anti-SMI (Fig. 14 et Fig. 15, respectivement). Comme illustré sur les figures 14 et 15, des éléments neuritiques synaptophysine- et SMI-immunoréactifs sont présents dans le

cerveau des souris double transgéniques et ils sont intimement associés aux dépôts A- β . De plus, nos résultats montrent que les éléments neuritiques sont très similaires à ceux décrits dans le cerveau humain AD.

Afin de démontrer si des dégénérescences neurofibrillaires sont aussi présentes dans le cerveau des souris double transgéniques, un double immunomarquage a été réalisé pour visualiser, sur une même coupe de cerveau, les dépôts A- β avec l'Ac anti-A β 4G8 et les dégénérescences neurofibrillaires avec l'Ac anti-*Tau-1*. Comme illustré sur la figure 16, l'Ac anti-*Tau-1* marque les éléments neuritiques tels que les neurites qui tapissent les dépôts A- β et les corps cellulaires anormaux. Ces deux types d'éléments immunomarqués sont présents dans les régions cérébrales riches en dépôts A- β (formation hippocampale et cortex) tandis qu'ils sont absents dans les régions sous-corticales pauvres ou dépourvues de dépôts A- β .

L'ensemble de ces résultats démontre clairement que des processus dégénératifs, en plus du phénomène de déposition d'amyloïde, se produisent au sein des structures cognitives chez les souris double transgéniques et ceci de façon similaire à ceux présents dans le cerveau AD.

EXEMPLE 6 : Présence d'astrocytes activés à l'intérieur ou autour des dépôts amyloïdes chez la souris double transgénique (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L)

Dans la mesure où les dépôts A- β dans le tissu cérébral AD sont associés avec des cellules gliales (les cellules inflammatoires du système nerveux central), il a été examiné si une réaction gliale dans le neuropil se produit chez nos souris transgéniques qui développent des dépôts A- β . Aucun astrocyte réactif GFAP-immunoréactif dans le cerveau ni des souris contrôles non transgéniques, ni des souris transgéniques qui ne développent pas de dépôts A- β (par exemple les souris simple transgéniques PDGF APP₆₉₅SDL ou HMG PS1M146L) n'a été observé. En revanche,

toutes les souris double transgéniques avec des dépôts A- β dans leur cerveau ont des astrocytes réactifs GFAP-immunoréactifs intimement associés aux dépôts A- β (Fig. 17).

5 EXEMPLE 7 : Mise en évidence d'un dysfonctionnement mitochondrial chez la souris double transgénique (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L)

Un immunomarquage simple a été réalisé pour visualiser la protéine Bax seule et un immunomarquage double pour visualiser, sur une même coupe de cerveau, la protéine Bax et les dépôts A- β ; ceci dans le but de déterminer une relation entre l'expression
10 de Bax et les plaques amyloïdes.

Les résultats du simple marquage ont montré que, chez les souris contrôles non transgéniques et aussi chez les souris transgéniques, la protéine Bax est exprimée dans les neurones de nombreuses structures cérébrales, telles que les couches neuronales de la formation hippocampale et toutes les régions corticales (Fig. 18A).
15 Néanmoins, seules les souris double transgéniques (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L), et non les souris simple transgéniques (PDGF APP₆₉₅SDL or HMG PS1M146L) ou contrôles non transgéniques, montrent une immunoréactivité Bax dans des éléments cellulaires tels que des neurites dystrophiques (Fig.18A), des corps cellulaires neuronaux semblables à des dégénérescences neurofibrillaires précoces, et
20 occasionnellement des cellules gliales activées (voir ci-dessous). De façon intéressante, ces éléments cellulaires Bax-immunoréactifs anormaux sont localisés exclusivement dans des régions cérébrales riches en dépôts A- β , comme le gyrus denté, les régions hippocampales CA1 et CA3, le subiculum, et les cortex cingulaire et entorhinal.

25

Le double immunomarquage avec les Ac anti-Bax et anti-A β a confirmé dans un deuxième temps que l'immunoréactivité Bax dans les éléments neuritiques et les

cellules gliales activées sont intimement associés aux dépôts A- β chez les animaux double transgéniques (Fig.18B, 18C). De tels éléments cellulaires Bax-immunoréactifs n'ont jamais été détectés dans le cerveau des animaux non transgéniques ou simples transgéniques. Dans ces études, l'immunomarquage Bax est
 5 spécifique comme l'ont démontré les expériences de préabsorption avec un peptide bloquant (Fig. 18D).

Les résultats de simple immunomarquage du cytochrome C ont montré que la protéine cytochrome C est exprimée dans les corps cellulaires neuronaux chez les 4
 10 groupes d'animaux examinés (contrôles non transgéniques, simple et double transgéniques- tableau I). Le pattern de distribution des neurones cytochrome C-immunoréactifs est similaire à celui décrit pour Bax. De façon intéressante, comme pour Bax, l'expression du cytochrome C est démontrée dans des éléments cellulaires tels que des neurites et des corps cellulaires neuronaux anormaux (Fig. 20A)
 15 uniquement chez la souris double transgénique. Ces éléments cellulaires cytochrome C-immunoréactifs ne sont jamais observés chez les souris simple transgéniques ou contrôle non transgénique (Fig.20A). Chez les souris double transgéniques, les éléments neuritiques cytochrome C-immunoréactifs, comme les éléments neuritiques Bax-immunoréactifs, sont localisés dans les structures cérébrales dans lesquelles les
 20 dépôts A- β sont présents, principalement le gyrus denté, les régions hippocampales CA1 et CA3, les cortex cingulaire (Fig. 20A). Le double immunomarquage du cytochrome C et des dépôts A- β montre que les éléments neuritiques cytochrome C-immunoréactifs chez ces animaux double transgéniques sont intimement associés aux plaques amyloïdes (Fig.20A). De la même manière que l'immunomarquage Bax,
 25 l'immunomarquage cytochrome C est spécifique comme l'ont démontré les expériences de préabsorption avec des protéines cytochrome C purifiées (Fig. 20B).

En parallèle aux expériences menées sur les souris transgéniques, les doubles immunomarquages Bax/A β et cytochrome C/A β ont été réalisés sur du tissu de cerveau humain postmortem d'un individu contrôle et d'un sujet AD. Les résultats obtenus (Fig. 19 et Fig.21) montrent que, dans le cerveau humain AD, les éléments

5 neuritiques Bax- ou cytochrome C-immunoréactifs tels que des neurites dystrophiques et des neurodégénérescences neurofibrillaires précoces sont présents à l'intérieur ou autour des plaques amyloïdes. Les éléments neuronaux anormaux, Bax- et cytochrome C-immunoréactifs n'ont pas été observés dans le tissu humain contrôle.

10 Afin de confirmer la présence dans le cerveau de souris double transgéniques des protéines Bax et cytochrome C dans des éléments neuritiques anormaux, des doubles marquages immunofluorescents ont également été réalisés, lesquels ont permis de démontrer la colocalisation de Bax avec l'APP, la PS1 et le cytochrome C dans les mêmes éléments neuritiques qui tapissent les dépôts A- β (Fig. 22et 23). Enfin la

15 colocalisation du cytochrome C avec la delta caténine dans ces mêmes éléments neuritiques a été montrée (Fig. 22).

Le fait que, Bax et cytochrome C soient surexprimées dans les éléments neuritiques tels que des neurites et des corps cellulaires neuronaux anormaux aussi bien dans le

20 cerveau humain AD que dans le cerveau des souris double transgéniques, démontre l'implication de ces protéines dans la régulation d'évènements précoces associés à la mort neuronale chez l'homme AD et dans ce modèle de souris transgéniques.

Ces données chez la souris sont les premières à démontrer que l'expression de deux protéines mitochondriales différentes, Bax et cytochrome C connues pour induire la

25 mort cellulaire en culture (voir introduction), est altérée dans le cerveau de souris transgéniques qui développent des dépôts A- β . Cette expression modifiée de Bax et cytochrome C consiste en l'accumulation des ces deux marqueurs mitochondriaux

dans des éléments neuronaux anormaux qui sont intimement associés aux plaques amyloïdes.

Un point important est que les éléments neuritiques Bax et cytochrome C-immunoréactifs chez la souris double transgénique sont semblables à ceux observés
5 dans le cerveau humain AD, ceci indiquant que le même type de dysfonctionnement mitochondrial est trouvé chez l'homme AD.

Tableau I

Dépôt Aβ et marqueurs de l'apoptose médiée par un dysfonctionnement mitochondrial dans des éléments neuritiques chez la souris double transgénique (PDGF APP ₆₉₅ SDL X HMG PS1M146L)																				
	Souris non transgéniques (littermate)					Souris simple transgéniques PDGF APP ₆₉₅ SDL					Souris simple transgéniques HMG PS1M146L					Souris double transgéniques PDGF APP ₆₉₅ SDL X HMGPS1M146L				
Age (mois)	6	9	12	15	18	6	9	12	15	18	6	9	12	15	18	6	9	12	15	
Expression du transgène (APP/PS1)	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-		
Dépôts A-β	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++		
Bax	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++		
Cytochrome C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++		

REFERENCES

- Czech, C., Delaere, P., Macq, A.-F., Reibaud, M., Dreisler, S., Touchet, N., Schomber, B., Mazadier, M., Mercken, L., Theisen, M., Pradier, L., Octave, J.-N., Beyreuther, K. and Tremp, G. L. (1997) Proteolytical processing of mutated human amyloid protein precursor in transgenic mice. *Mol. Brain Res.* **47**, 108-116.
- 5 Czech, C., Lesort, M., Tremp, G., Terro, F., Blanchard, V., Schombert, B., Carpentier, N., Dreisler, S., Bonici, B., Takashima, A., Moussaoui, S., Hugon, J. and Pradier, L. (1998) Characterization of human presenilin 1 transgenic rats: increased sensitivity to apoptosis in primary neuronal cultures. *Neuroscience* **87**, 325-36.
- 10 Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* **17**, 181-90.
- 15 Beal MF (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochimica Biophysica Acta* **1366** : 211-223.
- Begley J.G. et al. (1999) Altered Calcium Homeostasis and Mitochondrial Dysfunction in Cortical Synaptic Compartments of Presenilin-1 Mutant Mice *Journal of Neurochemistry* **72** : 1030-1039
- 20 Borchelt, DR et al. (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19** : 939-45.
- Brady HJM et al. (1998). Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **30** : 647-650.

- Chen KS et al. (1998). Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V_F transgenic mice. *Progr. Br. Res.* 117 :327-334.
- Chui, DH et al. (1999) Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* 5 : 560-4.
- 5 Gautier et al. (1989). A ubiquitous mammalian expression vector, pHMG, based on a housekeeping gene promoter., *Nucleic Acids Res* 17: 20, 8389.
- Green D. & Kroemer G. (1998). The central executioners of apoptosis : caspases or mitochondria ?. *Trends in Cell Biology* 8 : 267-271.
- Guo Q et al. (1996). Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid β -peptide. *Neuroreport* 8 : 379-383.
- 10 Guo Q. et al. (1997). Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide : involvement of calcium and oxyradicals. *J. Neurosci.* 17 : 4212-4222.
- 15 Guo Q et al. (1998). Calbindin blocks the pro-apoptotic actions of mutant presenilin-1 : reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *PNAS* 95 : 3227-3232.
- Holcomb L et al. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant APP and presenilin1 transgenes. *Nature Medicine* 4 : 97-100.
- 20 Hsiao, K et al. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274 : 99-102.
- Hyman BT, Marzloff K, Arriagada PV (1993). The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution., *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 6, 594-25 600.

- Irizarry MC et al. (1997a) APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1 [see comments]. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 56 : 965-73.
- Irizarry MC et al. (1997b) Abeta deposition is associated with neuropil changes, but
 5 not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 17 : 7053-9.
- Johnson-Wood K et al. (1997). Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 : 1550-5.
- 10 Jurgensmeier JM. et al. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *PNAS* 95 : 4997-5002.
- Kish SL et al. (1992). Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 59 : 776-779.
- MacGibbon, G. A., Lawlor, P. A., Sirimanne, E. S., Walton, M. R., Connor, B.,
 15 Young, D., Williams, C., Gluckman, P., Faull, R. L., Hughes, P. and Dragunow, M. (1997) Bax expression in mammalian neurons undergoing apoptosis, and in Alzheimer's disease hippocampus. *Brain Res* 750 : 223-34.
- Maslah E. et al. (1996) Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease.
 20 *Journal of Neuroscience* 16 : 5795-811.
- Moechars D et al. (1998) Transgenic mice expressing an alpha-secretion mutant of the amyloid precursor protein in the brain develop a progressive CNS disorder. *Behav Brain Res* 95 : 55-64.
- Moechars D et al. (1999a). Early phenotypic changes in transgenic mice that
 25 overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 274 : 6483-92.

- Moechars D. (1999b). Premature death in transgenic mice that overexpress a mutant amyloid precursor protein is preceded by severe neurodegeneration and apoptosis. *Neuroscience* 91 : 819-30.
- 5 Mutisya EM et al. (1994). Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 63 : 2179-2184.
- Nagy Z.S. and Esiri M.. (1997) Apoptosis-related Protein Expression in the Hippocampus in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging* 18 : 565-571
- 10 Narita M. et al. (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *PNAS* 95 : 14681-14686.
- Pappola M.A., Chian Y.J., Omar R.A., Hsiao K., Perry G., Smith M.A. and Bozner P.. (1998) Evidence of Oxidative Stress and *in vivo* Neurotoxicity of β -Amyloid in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology* 152 : 871-877.
- 15 Parker WD et al. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 26 : 719-723
- Parker WD et al. (1994). Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain, *Neurology* 44 : 1090-1096
- 20 Pastorino JG. et al. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biochem. Chem.* 273 : 7770-7775.
- Price DL and Sisodia SS (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* 21 : 479-505.
- 25 Sheehan J., Swerdlow R.H., Miller S.W., Davis R.E., Parks J.K., Davis Parker W. and Tuttle J.B.. (1997) Calcium Homeostasis and Reactive Oxygen Species

- Production in Cells Transformed by Mitochondria from Individuals with Sporadic Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 17 : 4612-4622.
- Smith MA. Et al. (1998). Amyloid deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J. Neurochem.* 70 : 2212-2215.
- 5 Sturchler-Pierrat C et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 : 13287-92.
- Su J.H., Deng G., and Cotman C.W.. (1997) Bax Protein Expression Is Increased in Alzheimer's Brain : Correlations with DNA Damage, Bcl-2 Expression, and Brain
10 Pathology. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56 : 86-93.
- Tatton WG. Et al. (1998). Mitochondria in Neurodegenerative apoptosis : An opportunity for therapy ? *Ann. Neurol.* 44(Suppl.1) : S134-S141.
- Tortosa, A., Lopez, E. and Ferrer, I. (1997) Bcl-2 and Bax proteins in Lewy bodies from patients with Parkinson's disease and Diffuse Lewy body disease. *Neurosci Lett*
15 238 : 78-80.
- Tortosa, A., Lopez, E. and Ferrer, I. (1998) Bcl-2 and Bax protein expression in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 95 : 407-12.
- Xiang J. et al. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases. *PNAS* 93: 14559-15563.
- 20 Yankner BA (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 16 : 921-932.
- Gautier, C., Methali, M. and Lathe, R. (1989) A ubiquitous mammalian expression vektor, pHMG, based on a housekeeping gene promoter. *Nucleic. Acids. Res.* 17, 8398
25
- Luthi, A., Putten, H., Botteri, F. M., Mansuy, I. M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Schroder, M., Nitsch, C., Laurent, J. P. and Monard, D.

- (1997) Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 17, 4688-99.
- 5 Sasahara, M., Fries, J. W., Raines, E. W., Gown, A. M., Westrum, L. E., Frosch, M. P., Bonthron, D. T., Ross, R. and Collins, T. (1991) PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell* 64, 217-27.
- 10 Scott, M. R., Kohler, R., Foster, D. and Prusiner, S. B. (1992) Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci* 1, 986-97.

REVENDICATIONS

1. Modèle animal transgénique non-humain de la maladie d'Alzheimer présentant à la fois des plaques amyloïdes et un dysfonctionnement mitochondrial.
2. Modèle animal selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il coexprime le précurseur du peptide β -amyloïde (APP) et une préséniline, de préférence la préséniline 1 (PS1).
3. Modèle animal selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il coexprime des formes mutées de l'APP et/ou de PS1.
4. Mutation telle que décrite selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une mutation dans le gène de l'APP choisie parmi les mutations "Swedish", "London" et "Dutch" seules ou en combinaison.
5. Mutation telle que décrite selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une mutation dans le gène de la PS1 choisie parmi les mutations M146L, A246E, C410Y, H163R, L286V, L235P, seule ou en combinaison.
6. Mutation selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de la mutation M146L.
7. Modèle animal selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dysfonctionnement mitochondrial correspond à une altération, une modification, une surexpression ou une inhibition de l'expression des protéines mitochondriales.
8. Protéines mitochondriales telles que décrites dans la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles sont intramitochondriales.
9. Protéines mitochondriales telles que décrites dans la revendication 8, caractérisées en qu'il s'agit des protéines BAX et/ou cytochrome C.

10. Utilisation du modèle animal tel que décrit selon les revendications 1 à 9 pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie d'Alzheimer.
11. Cellule extraite d'un modèle animal tel que décrit selon les revendications 1 à 9.
- 5 12. Utilisation d'une cellule telle que décrite selon la revendication 11, pour la mise en évidence de composés destinés au traitement des maladies neurodégénératives, de préférence la maladie d'Alzheimer.

La présente invention résulte donc de la mise en évidence pour la première fois que les dépôts amyloïdes sont associés à des dysfonctionnements mitochondriaux *in vivo* dans le cerveau d'animaux transgéniques. En outre, l'invention résulte également de la recherche d'un nouveau modèle animal de l'AD plus représentatif et reproduisant la neuropathologie rencontrée chez l'homme.

Un premier objet de l'invention concerne donc un modèle animal transgénique de la maladie d'Alzheimer présentant à la fois des plaques amyloïdes et un dysfonctionnement mitochondrial. Avantageusement il coexprime le précurseur du peptide β amyloïde (APP) et une préséniline, de préférence la PS₁.

On entend par animal transgénique tout animal non-humain présentant une modification de son génome. La modification du génome peut résulter d'une altération ou une modification de un ou plusieurs gènes par "knock-in" ou par "knock-out". Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques ou bien effectuée par mutagenèse dirigée, comme cela est décrit dans Matériels et Methodes.

La modification du génome peut également résulter d'une insertion de gène(s) ou de remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée.

Les modifications du génome sont avantageusement effectuées sur des cellules souches reproductrices et avantageusement sur les pronucléi.

Dans le cadre de la présente invention, le modèle animal est avantageusement un mammifère. En particulier il peut s'agir d'une souris, d'un rat ou d'un lapin obtenu selon les techniques classiques de transgénèse. A titre d'exemple illustrant l'un des procédés de transgénèse, on peut citer la méthode de microinjection d'une cassette d'expression comprenant les gènes modifiés dans les deux pronucléi fécondés, tel que cela est décrit dans Matériels et Méthodes.

A cet égard, le modèle animal de l'invention est obtenu par injection d'une cassette d'expression comprenant un acide nucléique. De manière préférentielle, cet acide

Sont également comprises par mutation London toutes les substitutions autres que par l'isoleucine qui sont situées en position 717 par référence à l'APP770, telles que par exemple les mutations V 717 G et V 717 F.

Il est entendu que l'APP utilisable dans le cadre de l'invention, peut être sous
5 différentes isoformes et en particulier dans les formes 695, 751 et 770 ou dans une forme tronquée telle que par exemple l'isoforme APP99.

Les mutations dans le gène de PS1 peuvent être l'une des 40 mutations décrites jusqu'à présent dans la littérature. De manière préférentielle, les mutations dans le gène de PS1 sont choisies parmi les mutations M146L, A246E, C410Y, H163R,
10 L286V, L235P, etc..., seules ou en combinaison.

Pour la réalisation d'un modèle selon l'invention, la mutation M146L est préférée.

Dans le cadre du modèle de l'invention, l'ADN est placé sous le contrôle de séquences permettant son expression et en particulier de séquences promotrices de la transcription.

15 A titre de séquences promotrices, on peut citer tout particulièrement le promoteur HMG (Gautier et al., 1989), ainsi que le promoteur PDGF (Sasahan et al., 1991), le promoteur Thy-1 (Lüthi et al.,) et le promoteur du gène du Prion (Scott et al., 1992).

Selon une mise en œuvre particulièrement intéressante de l'invention, le modèle animal comprend le gène de l'APP ayant les mutations S, D et L, placé sous le
20 contrôle du promoteur PDGF et le gène de la PS1 ayant la mutation M146 L placé sous le contrôle du promoteur HMG.

Le modèle animal selon l'invention est très avantageux car il correspond à un modèle très représentatif de l'AD. En effet, ce modèle développe des plaques amyloïdes dès l'âge de 6 mois ce qui permet un temps d'élevage des animaux très court et coexprime
25 l'APP et PS1 mutées à des niveaux bien supérieurs aux niveaux endogènes; au moins

Afin de démontrer si les différents modèles de souris transgéniques générés développent des dépôts A- β dans le cerveau, nous avons utilisé à la fois différents Ac anti-A β (voir Matériel et Méthodes) et des marqueurs histologiques classiques (Thioflavine S et Rouge Congo) connus pour colorer les dépôts A- β dans le tissu
5 humain de sujets atteints de AD.

En utilisant l'ensemble de ces marqueurs des dépôts A- β , nous avons démontré qu'aucune des souris simple transgéniques, PDGF APP₆₉₅SDL ou HMG PS1M146L, ne présente de déposition d'amyloïde dans le cerveau aux âges 3, 6, 9, 12 et 15 mois. En revanche, les souris double transgéniques PDGF APP₆₉₅SDL x HMGPS1M146L
10 présentent des dépôts A- β dès l'âge de 6 mois. L'existence d'un tel processus de déposition de la protéine amyloïde est démontrée avec les différents Ac anti-A β utilisés (Fig. 4 et 5). Ces dépôts A- β sont également colorés par la Thioflavine S et le Rouge Congo, confirmant ainsi leur conformation fibrillaire (Fig.6).

15 **EXEMPLE 4 : Progression et profil régional de la déposition de l'amyloïde chez les souris double transgéniques (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L)**

Dans le but d'évaluer la progression et le profil de distribution régionale de la déposition de l'amyloïde résultant de l'expression du transgène chez les souris doubles transgéniques (PDGF APP₆₉₅SDL x HMG PS1M146L), le nombre de dépôts
20 A- β sur des coupes d'hémicerveau de 6 μ m d'épaisseur à différents âges et la charge en amyloïde sur des coupes de 25 μ m d'épaisseur à l'âge de 12 mois ont été quantifiés via l'utilisation de l'Ac anti-A β 4G8. Pour la quantification de la charge en amyloïde, nous nous sommes focalisés sur le cortex et l'hippocampe car ce sont deux structures cérébrales impliquées de manière précoce et prédominante dans la neuropathologie
25 chez les souris transgéniques et chez l'homme atteint de AD.

Le nombre de dépôts A- β est plus élevé chez les souris à 12 mois que chez les souris âgées de 6 et 9 mois, comme le montre de manière qualitative et quantitative les

REVENDICATIONS

1. Modèle animal transgénique non-humain de la maladie d'Alzheimer présentant à la fois des plaques amyloïdes et un dysfonctionnement mitochondrial.
2. Modèle animal selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il coexprime le
5 précurseur du peptide β -amyloïde (APP) et une préséniline, de préférence la préséniline 1 (PS1).
3. Modèle animal selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il coexprime des formes mutées de l'APP et/ou de PS1.
4. Modèle animal selon la revendication 3, caractérisé en ce que la mutation dans le
10 gène de l'APP est choisie parmi les mutations "Swedish", "London" et "Dutch" seules ou en combinaison.
5. Modèle animal selon la revendication 3, caractérisé en ce que la mutation dans le gène de la PS1 est choisie parmi les mutations M146L, A246E, C410Y, H163R, L286V, L235P, seule ou en combinaison.
- 15 6. Modèle animal la revendication 5, caractérisé en ce que la mutation est M146L.
7. Modèle animal selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dysfonctionnement mitochondrial correspond à une altération, une modification, une surexpression ou une inhibition de l'expression des protéines mitochondriales.
8. Modèle animal selon la revendication 7, caractérisé en ce que les protéines sont
20 intramitochondriales.
9. Modèle selon la revendication 8, caractérisé en ce que les protéines sont les protéines BAX et/ou cytochrome C.



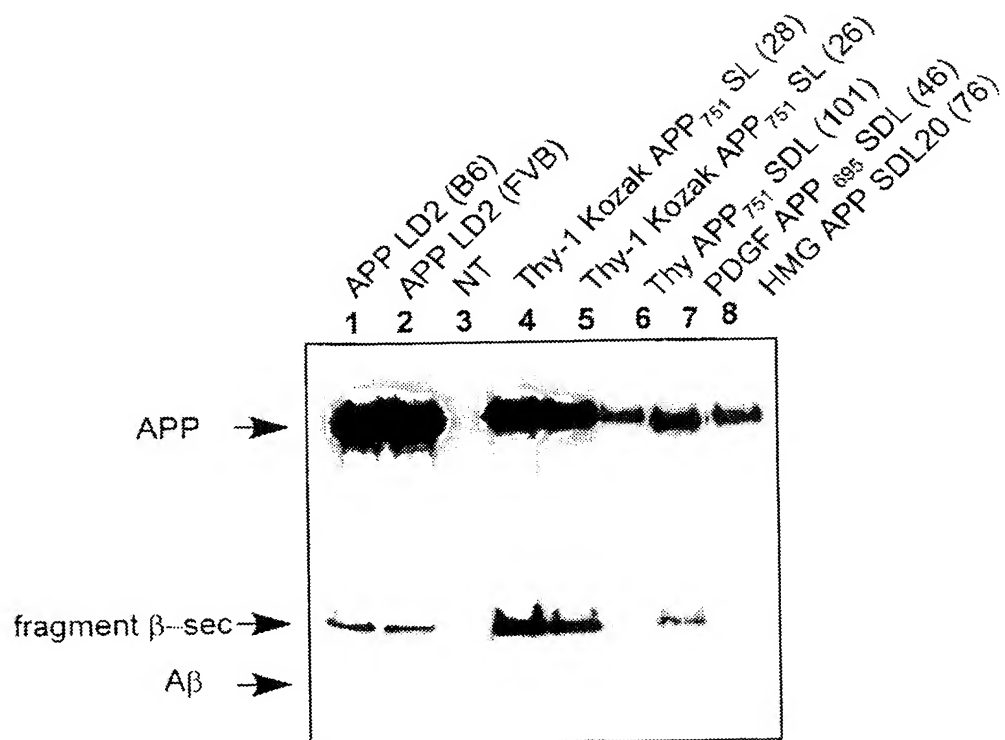


Figure 1

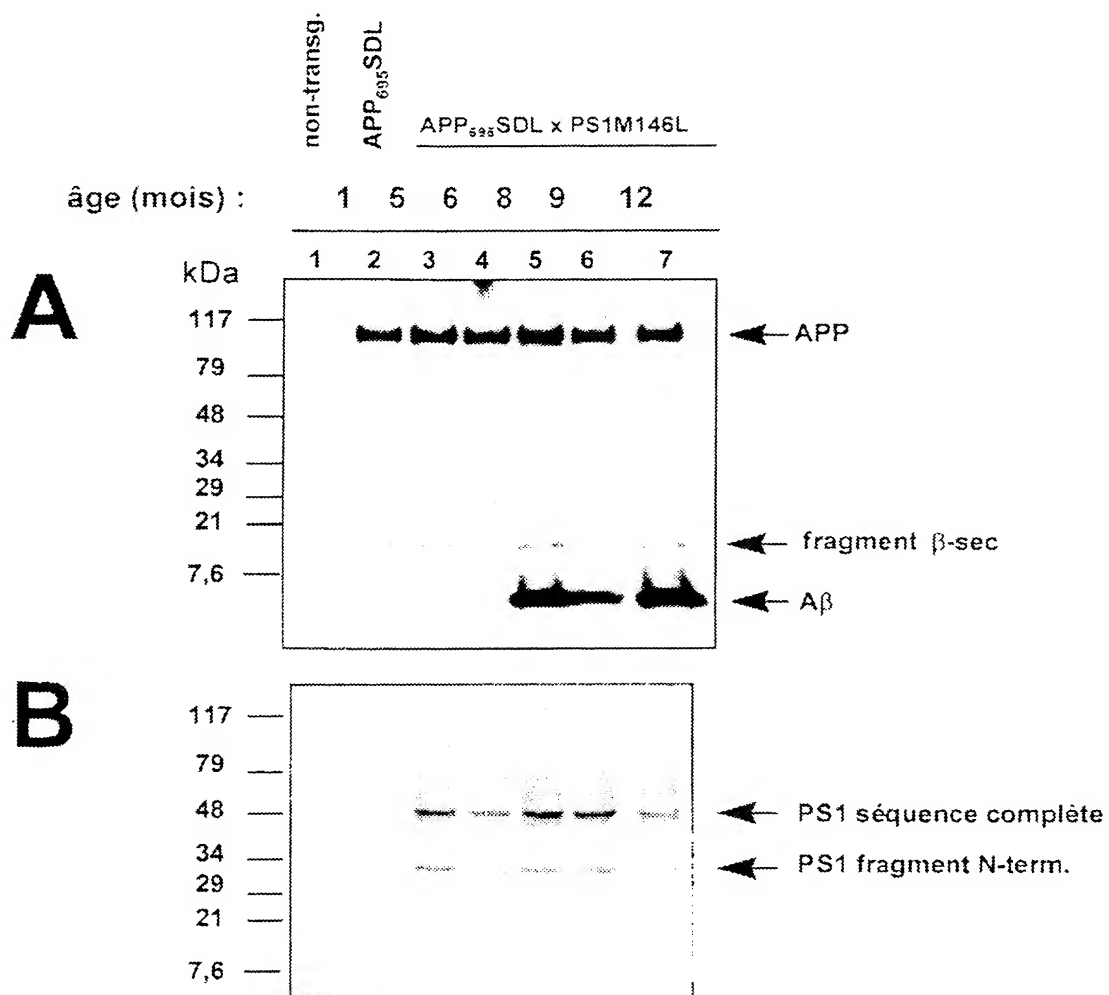


Figure 2

APP (22C11)

Contrôle non-transgénique	Simple transgénique PDGF APP ₆₉₅ SDL	Double transgénique APP ₆₉₅ SDL x PS1M146L
(a1)	(b1)	(c1)
(a2)	(b2)	(c2)

PS1 (Chemicon)

Contrôle non-transgénique	Simple transgénique PS1M146L	Double transgénique APP ₆₉₅ SDL x PS1M146L
(d1)	(e1)	(f1)
(d2)	(e2)	(f2)

Figure 3

4/27

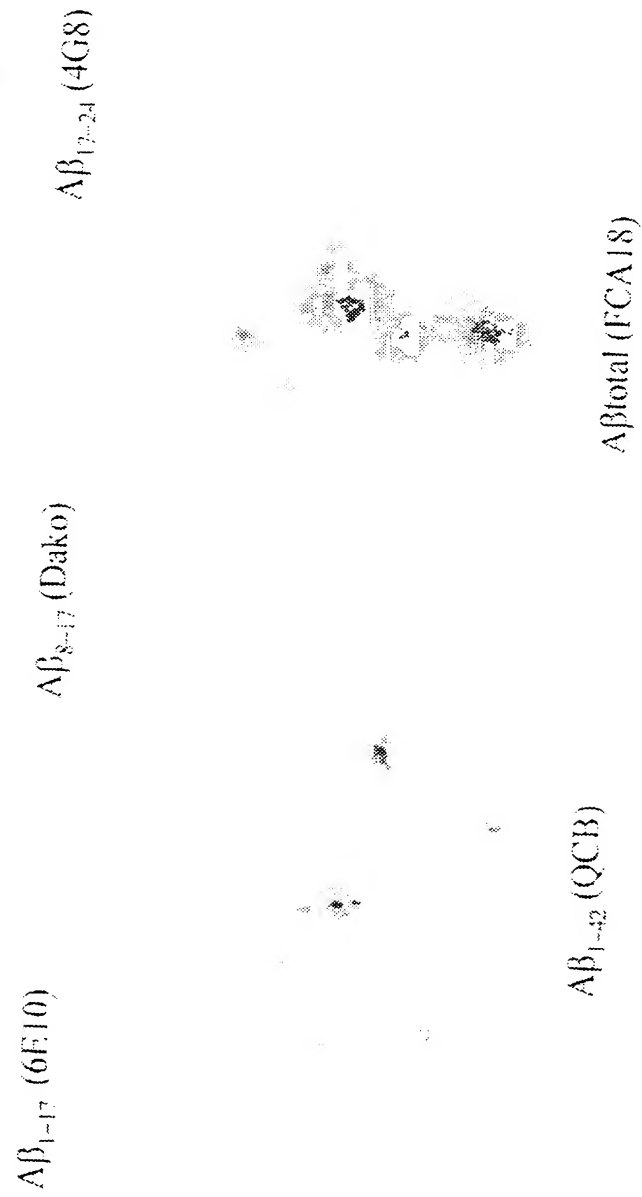


Figure 4

5/27

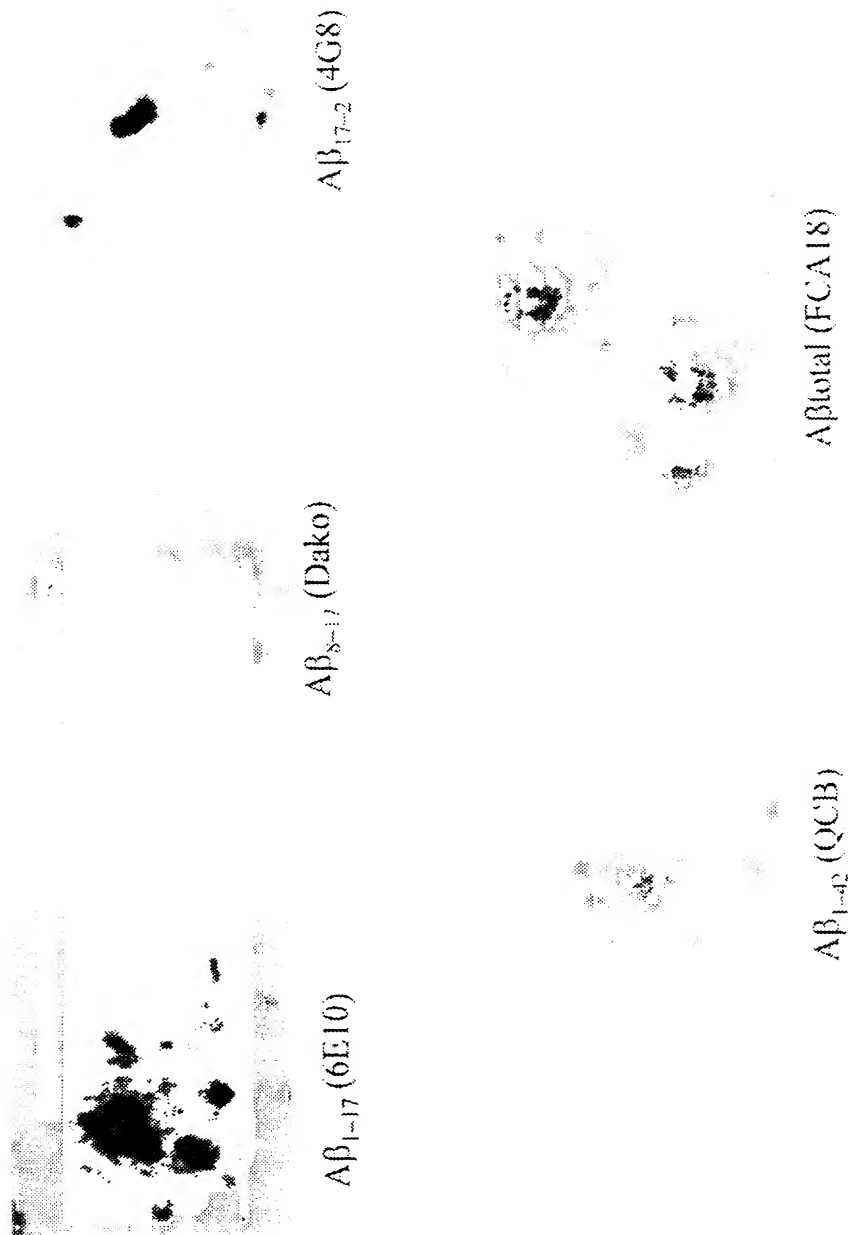
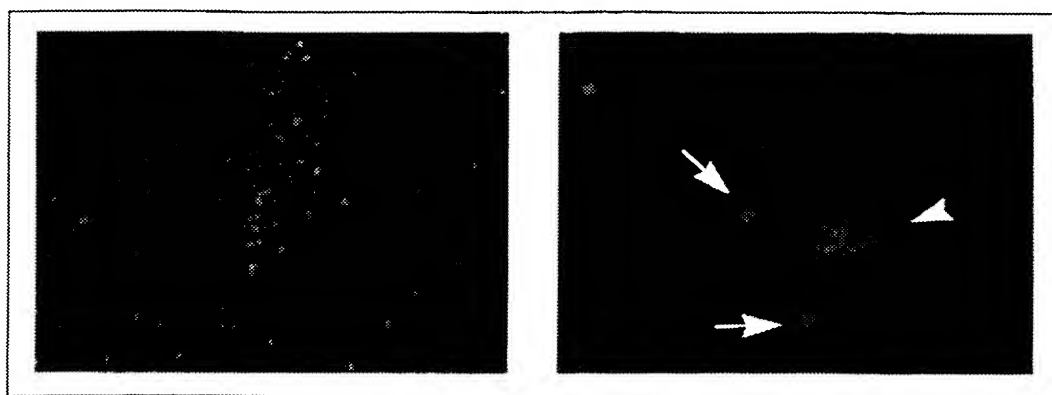


Figure 5

6/27

Thioflavine S



Congo Red

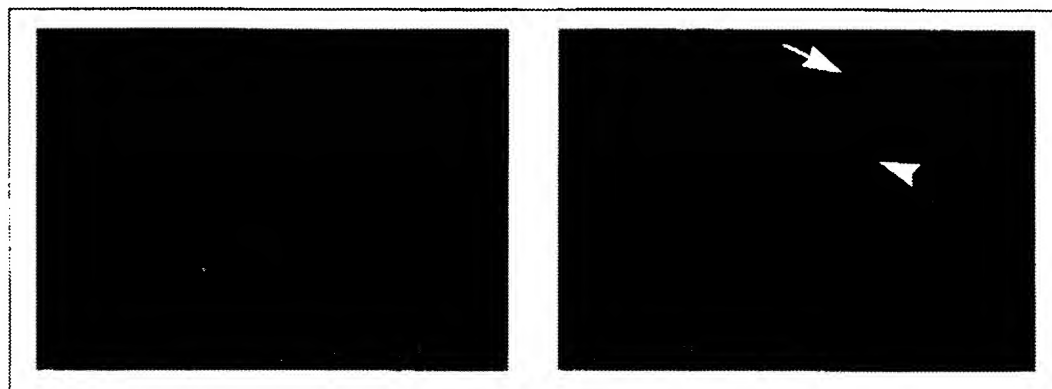
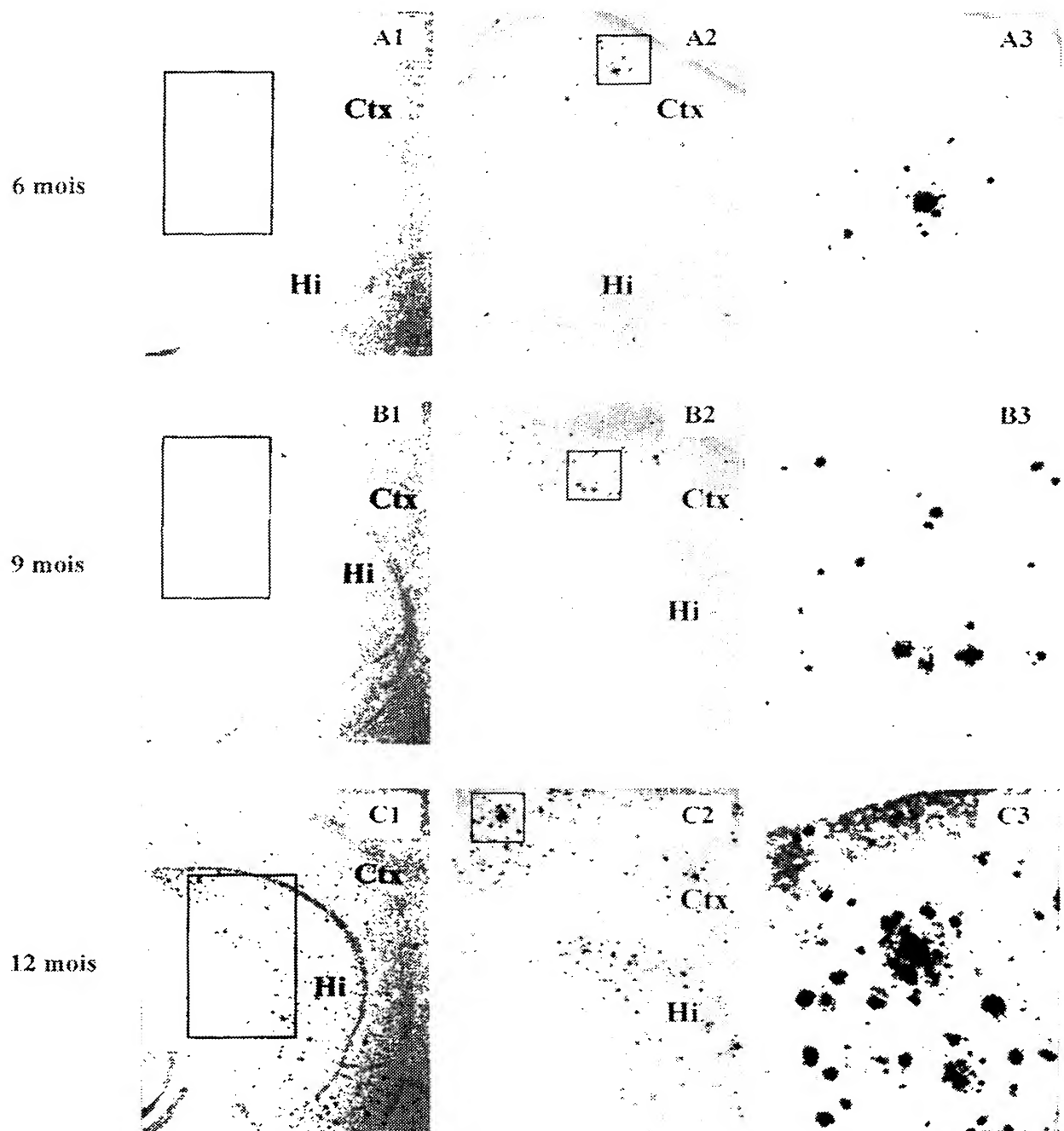


Figure 6



A β (4G8)

Figure 7

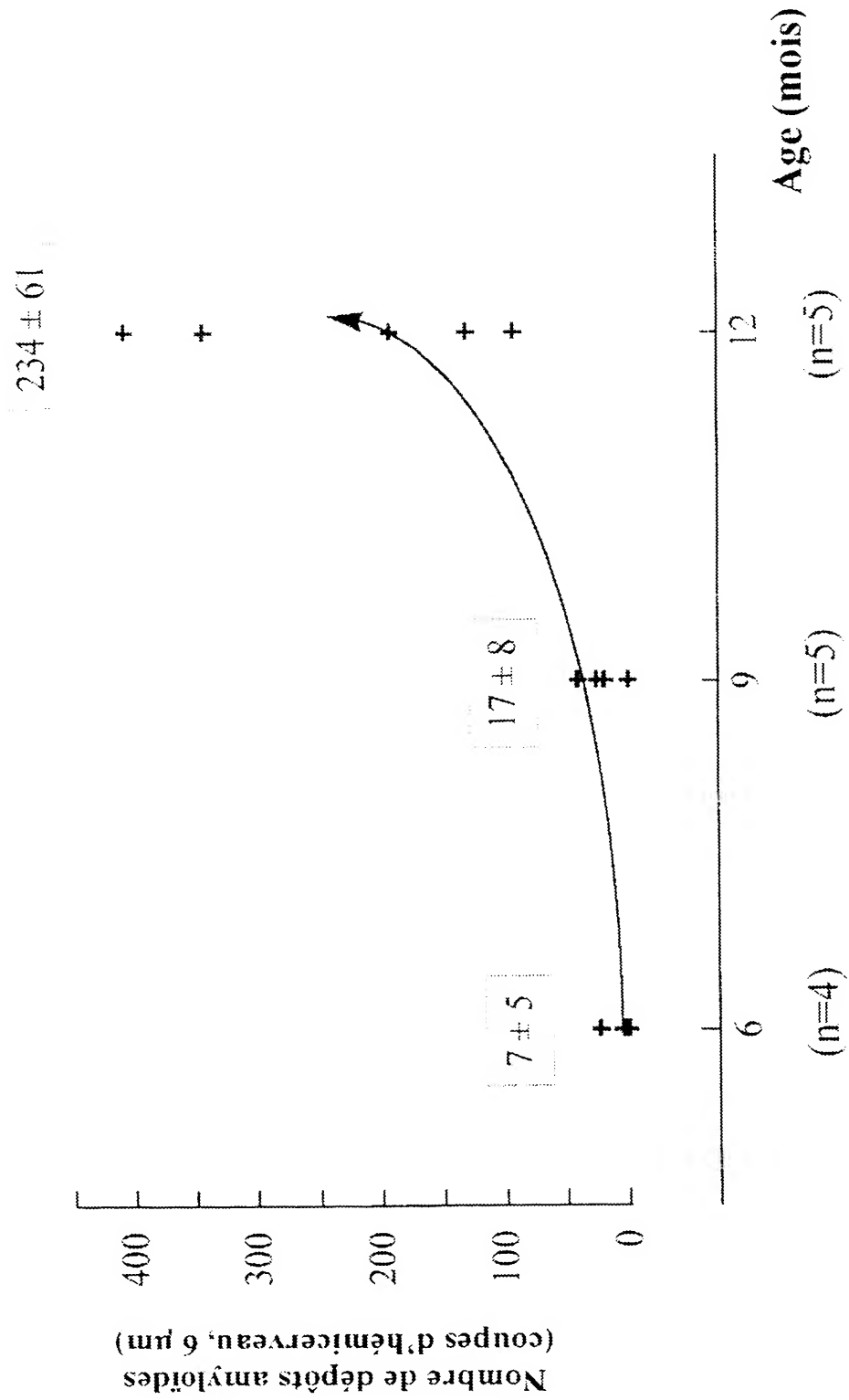


Figure 8

9.27

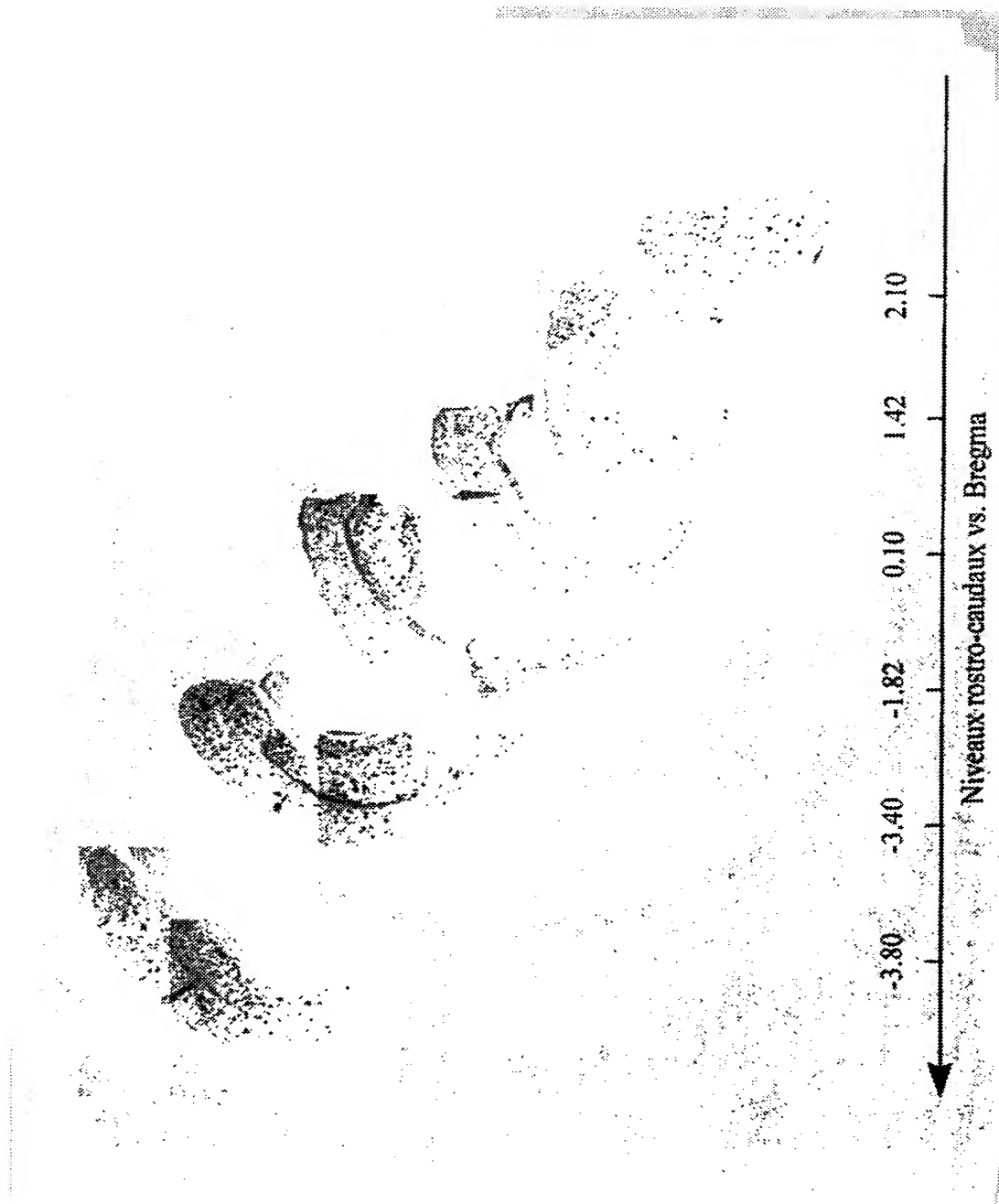


Figure 9

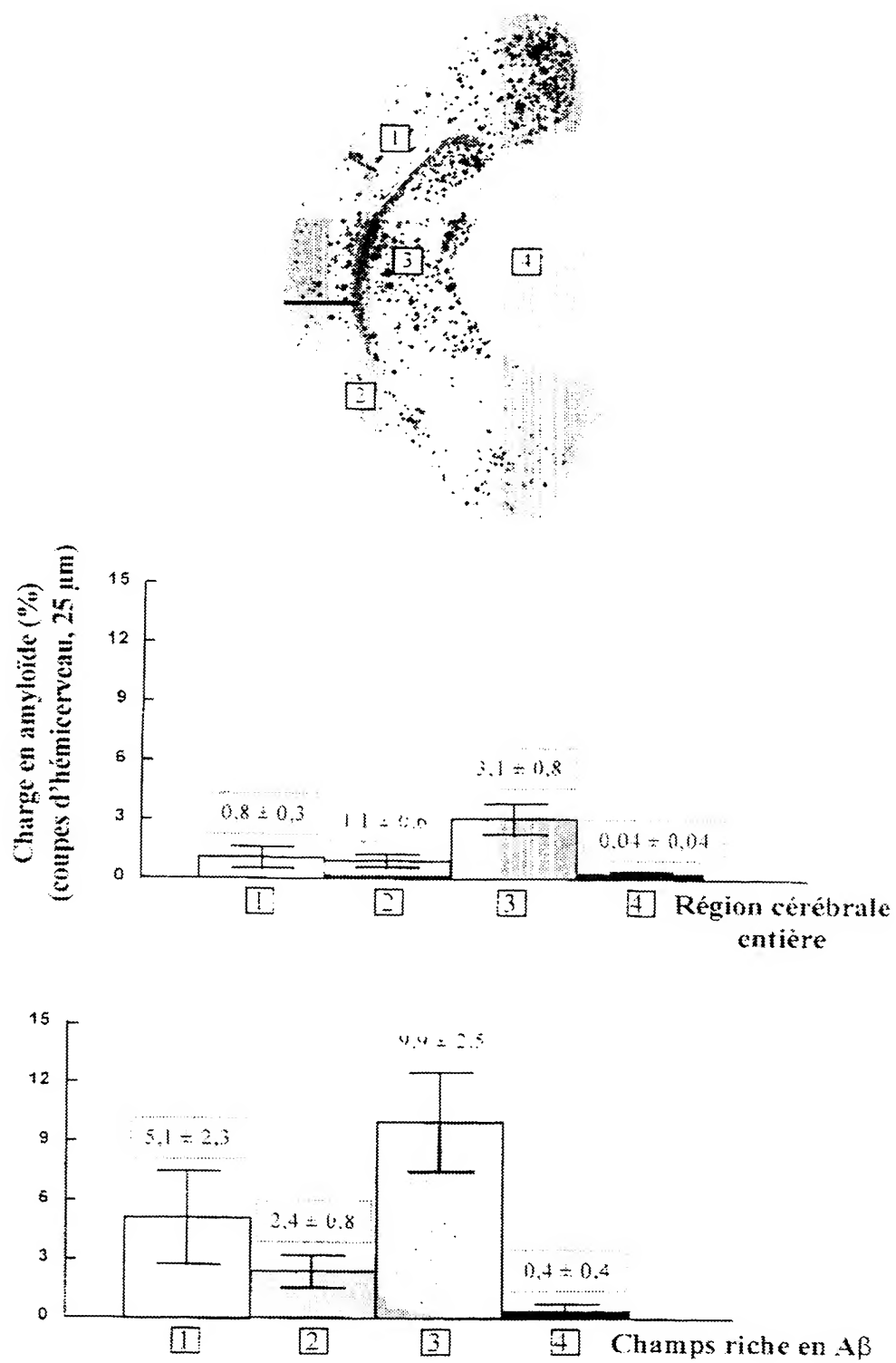


Figure 10

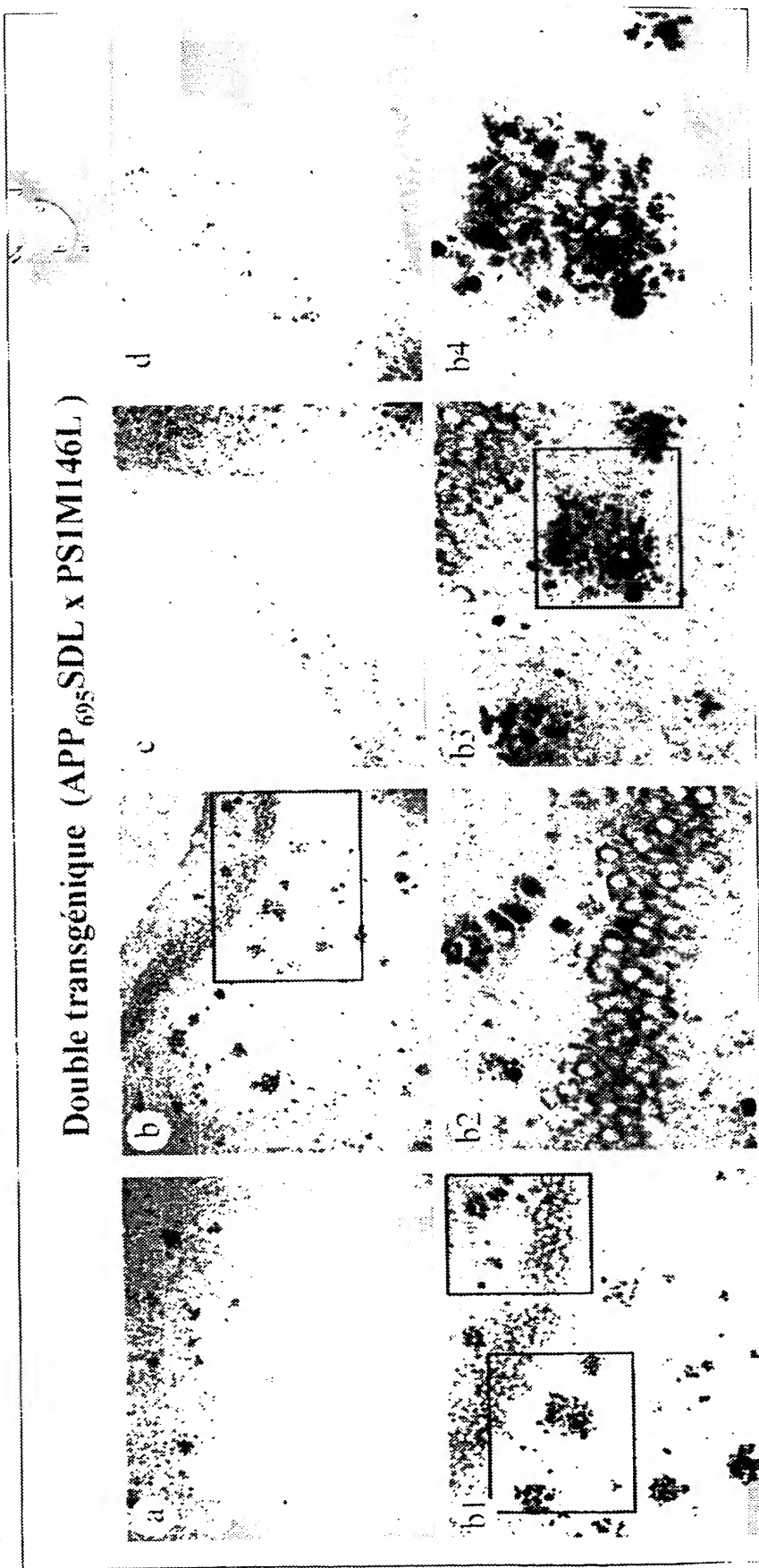
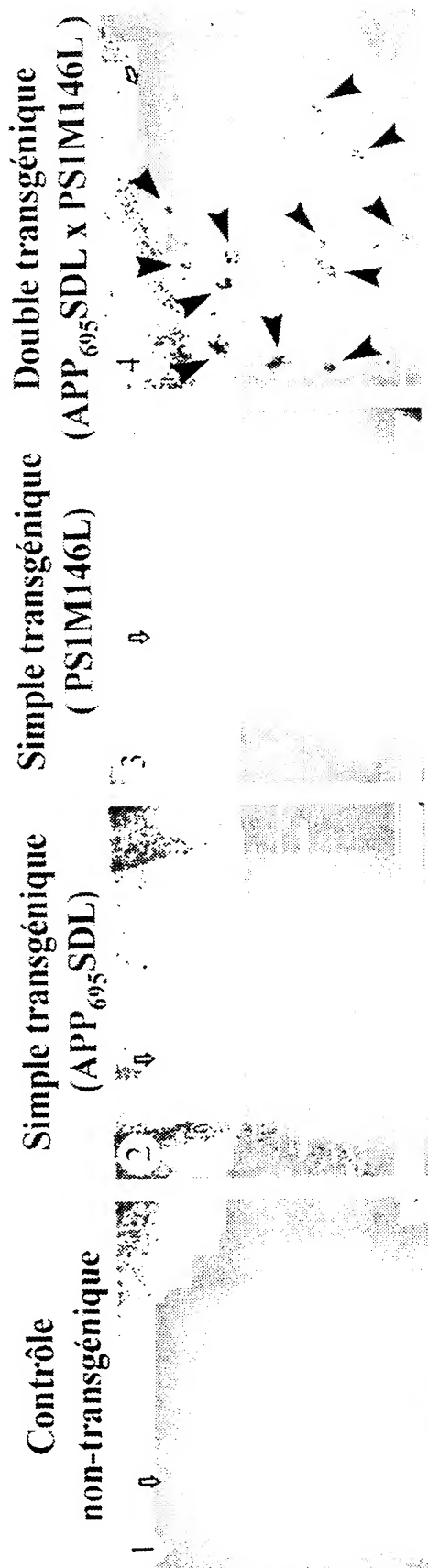
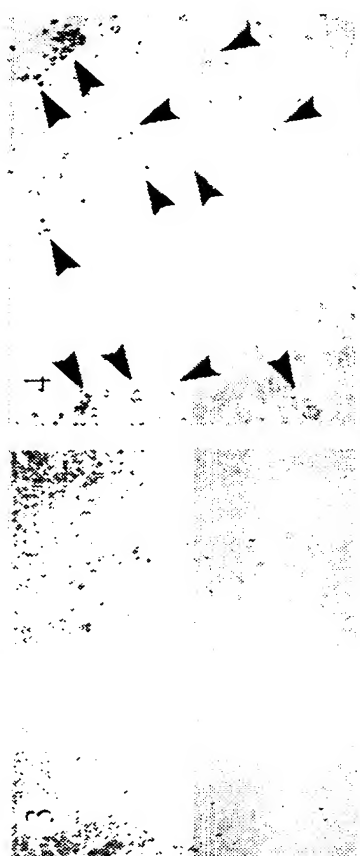


Figure 11

Contrôle non-transgénique	Simple transgénique (APP ₆₉₅ SDL)	Simple transgénique (PS1M146L)	Double transgénique (APP ₆₉₅ SDL x PS1M146L)
------------------------------	---	-----------------------------------	--



Double transgénique (APP₆₉₅SDL x PS1M146L)



Figure 12

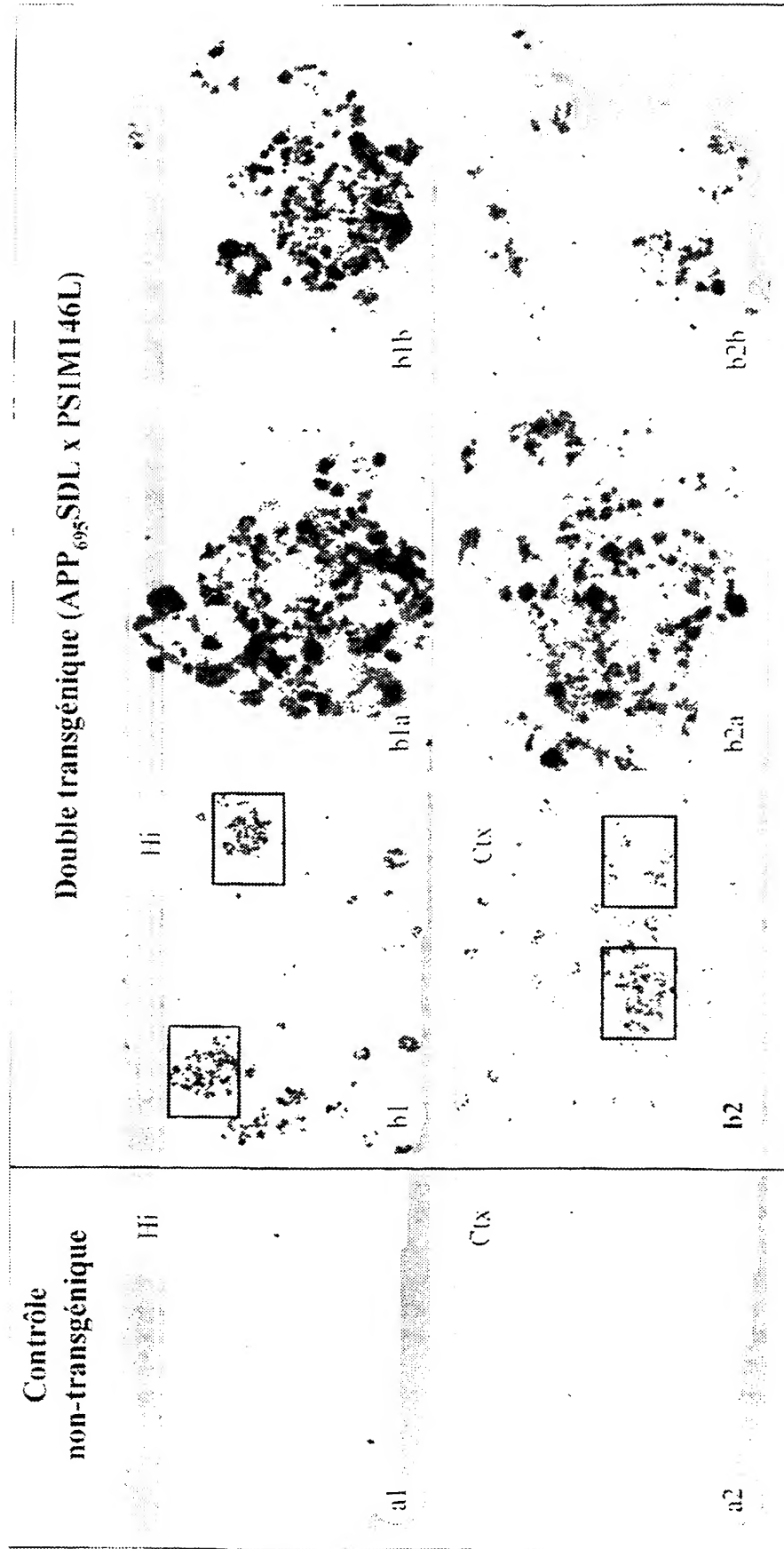


Figure 13

Souris double transgénique (APP₆₉₅SDL x PS1M146L)

Tissu humain AD

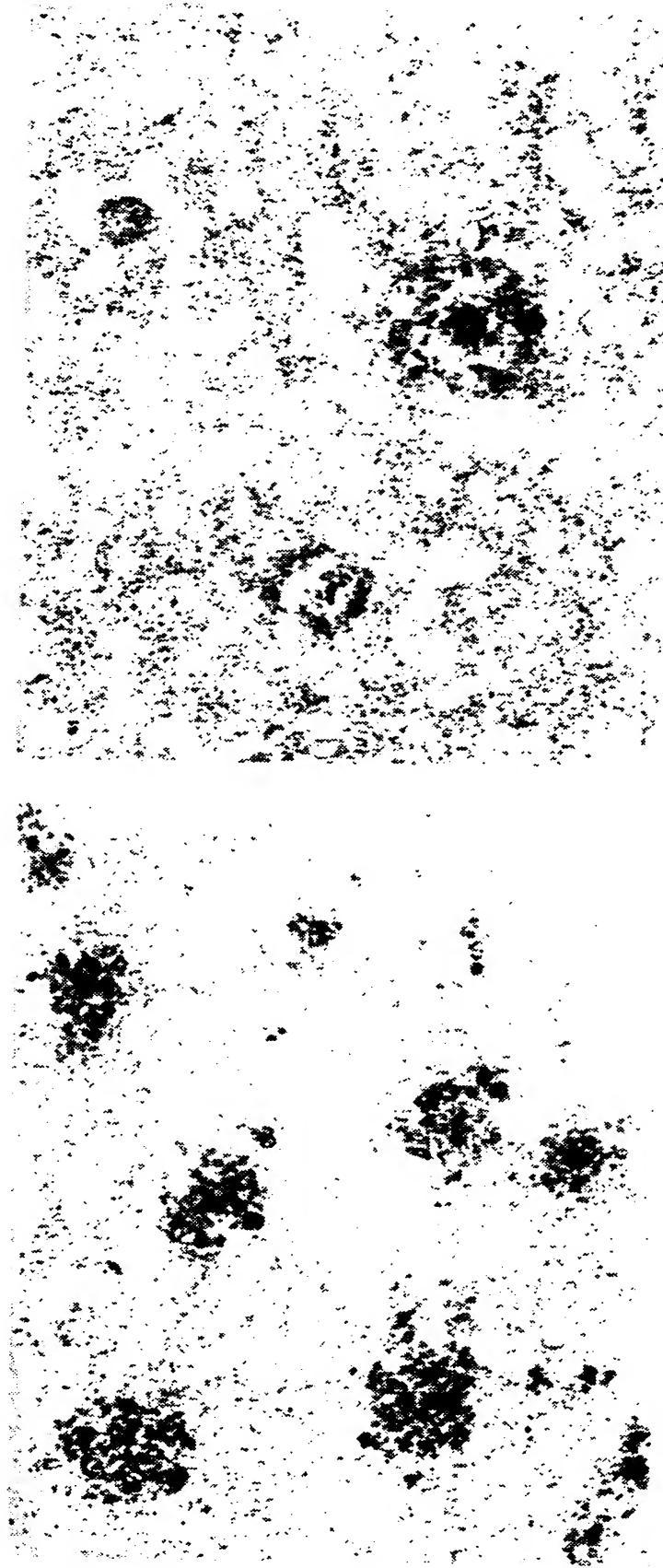


Figure 14

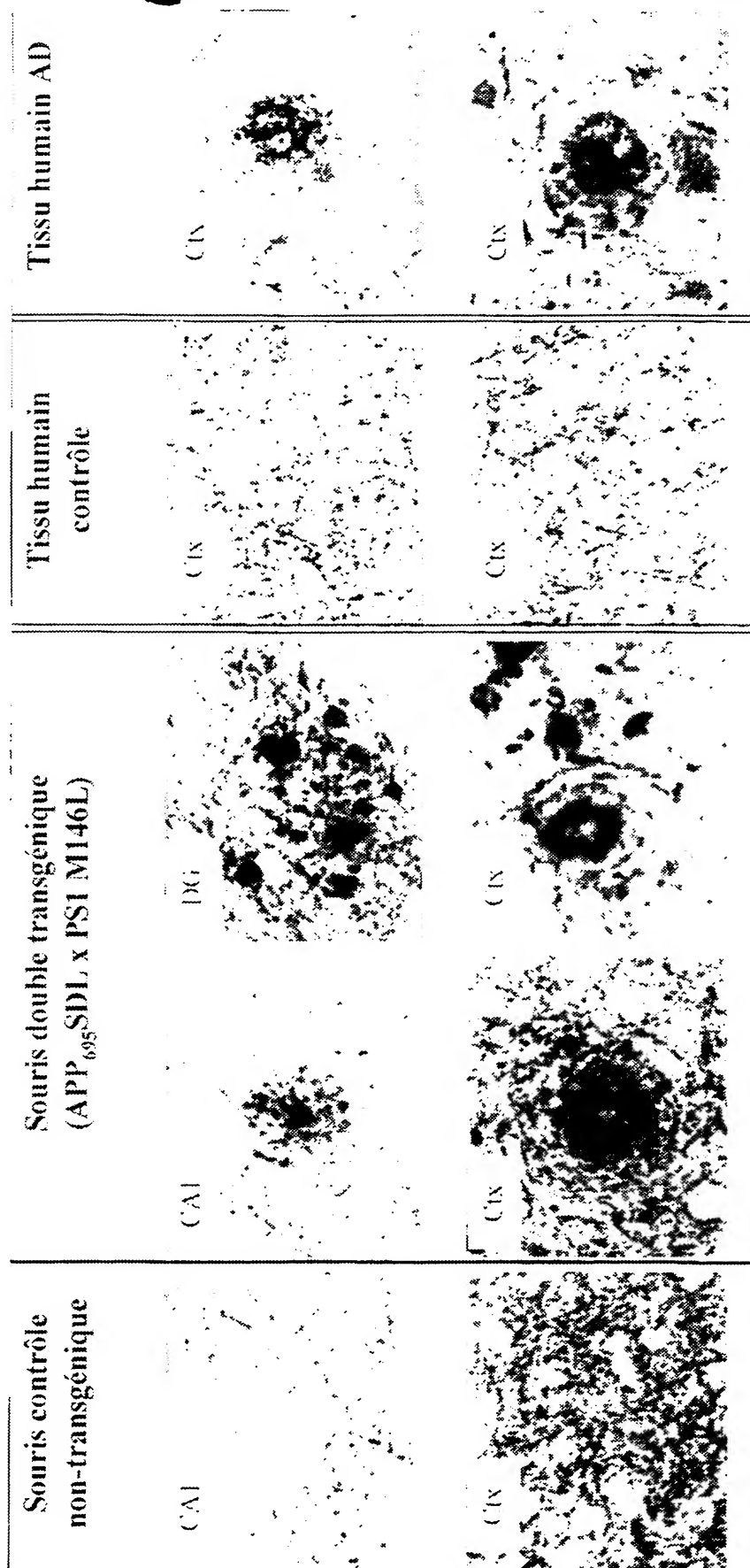


Figure 15

Contrôle
non-transgénique

Double transgénique
(APP₆₉₅SDL x PS1MI46L)

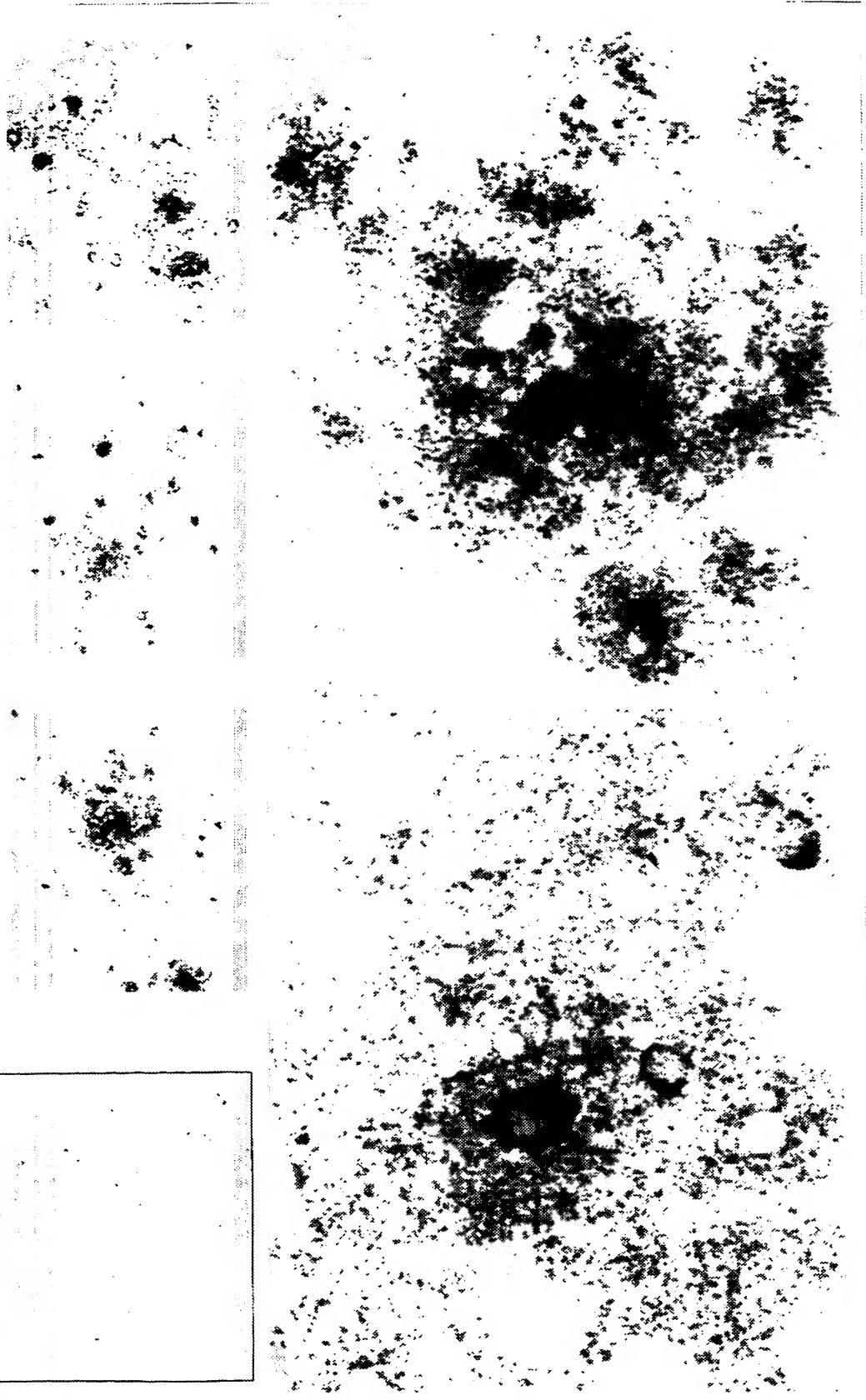


Figure 16

Souris double transgénique (APP₆₉₅SDL x PS1M146L)

Tissu humain AD



17 27

Figure 17

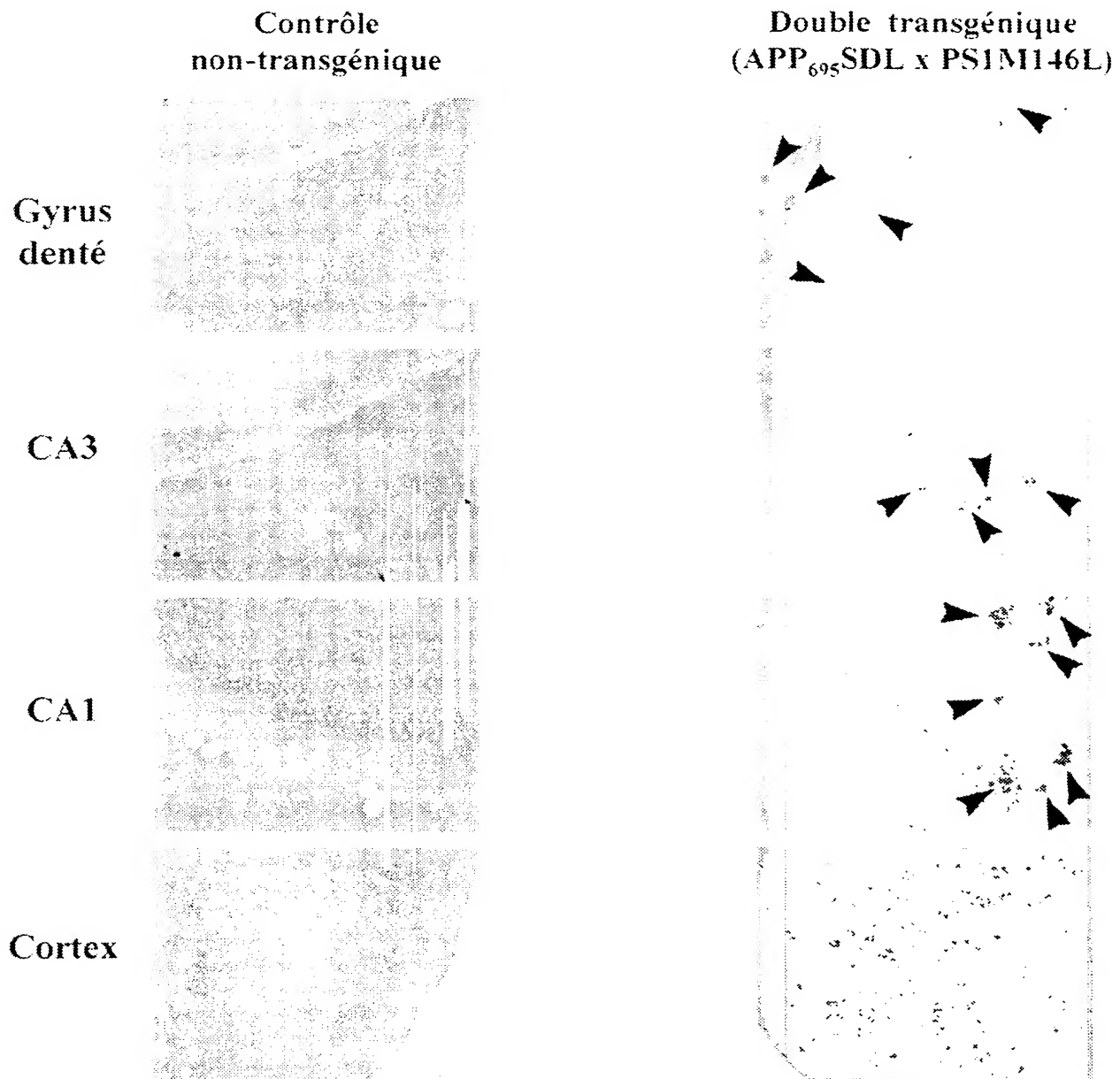
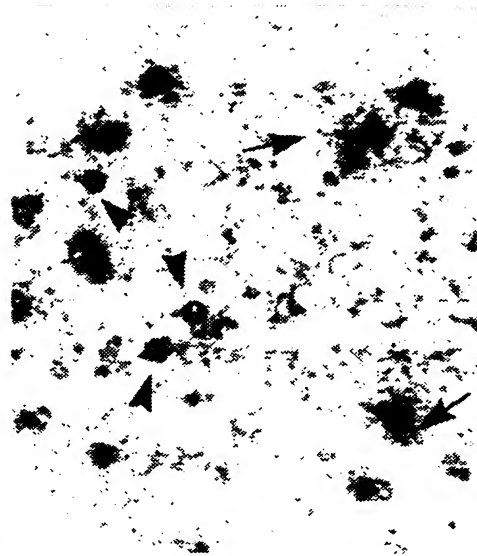
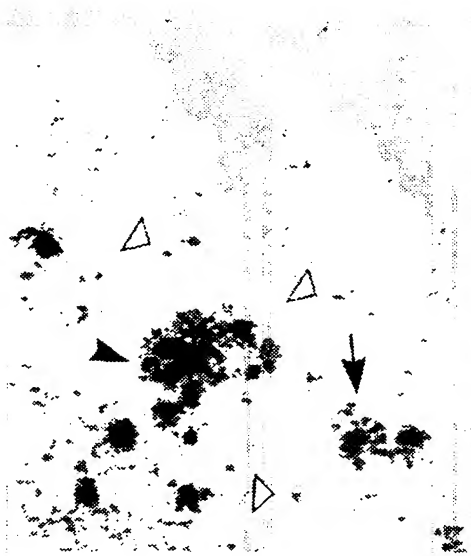


Figure 18A

Gyrus denté



CA3

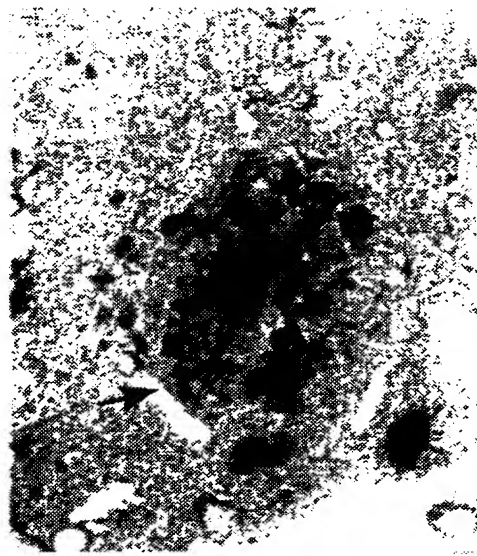


Figure 188

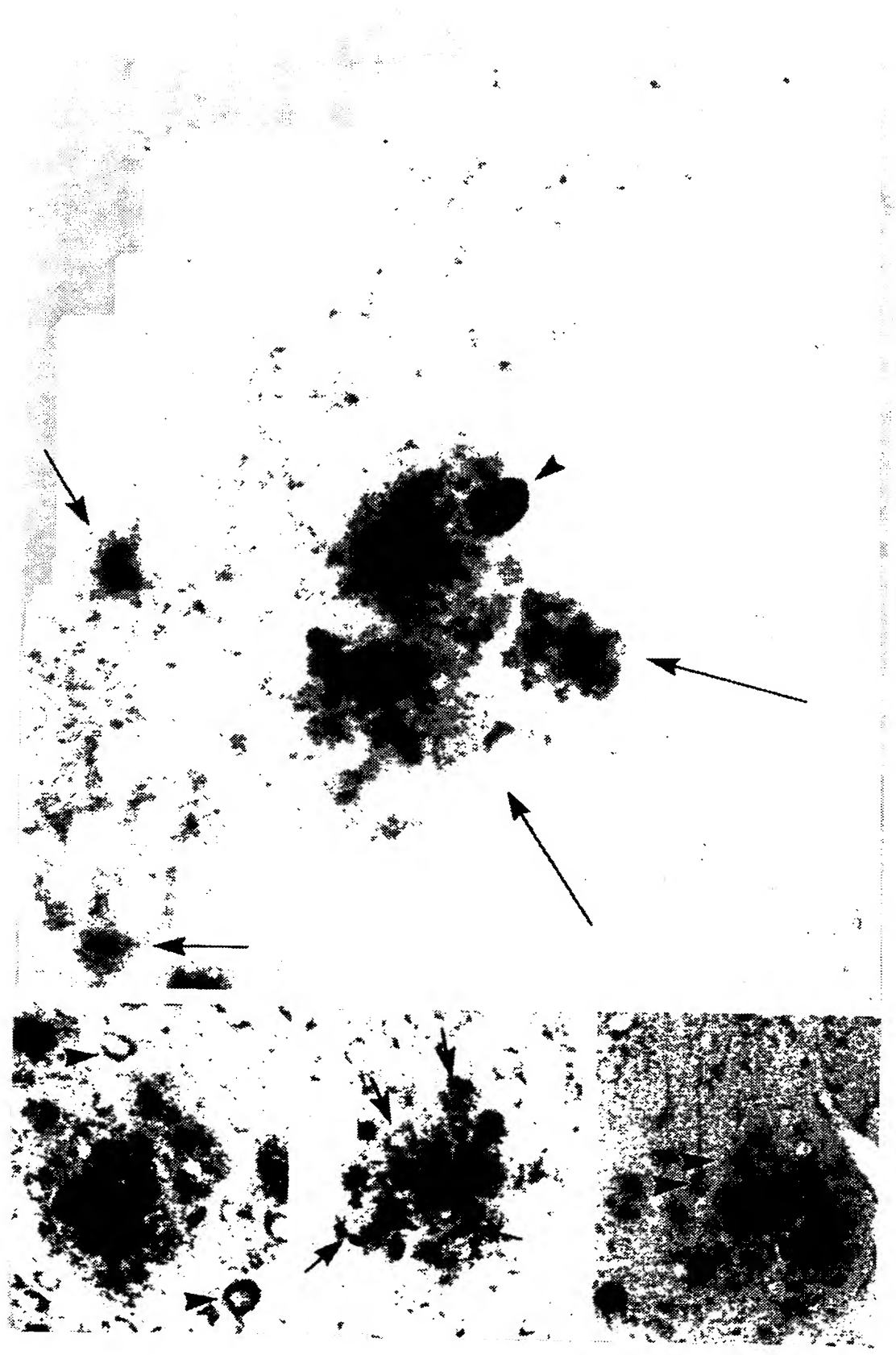


Figure 18C

Anticorps Bax P19



Anticorps Bax P19 + Peptide P19



Peptide P19
(0.02 mg/ml)

Peptide P19
(0.2 mg/ml)

Gyrus denté CA1 Cortex

Figure 180

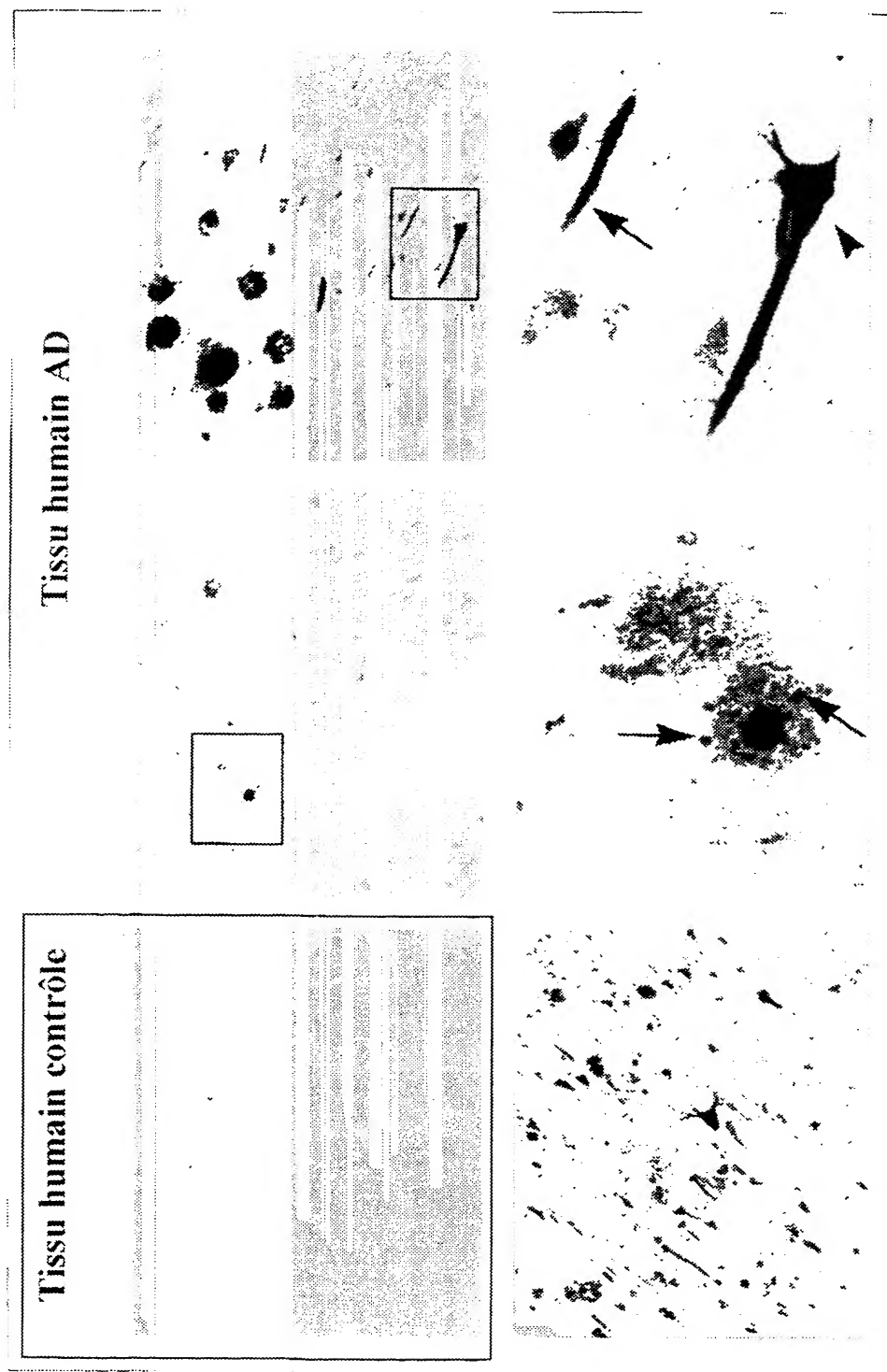


Figure 19

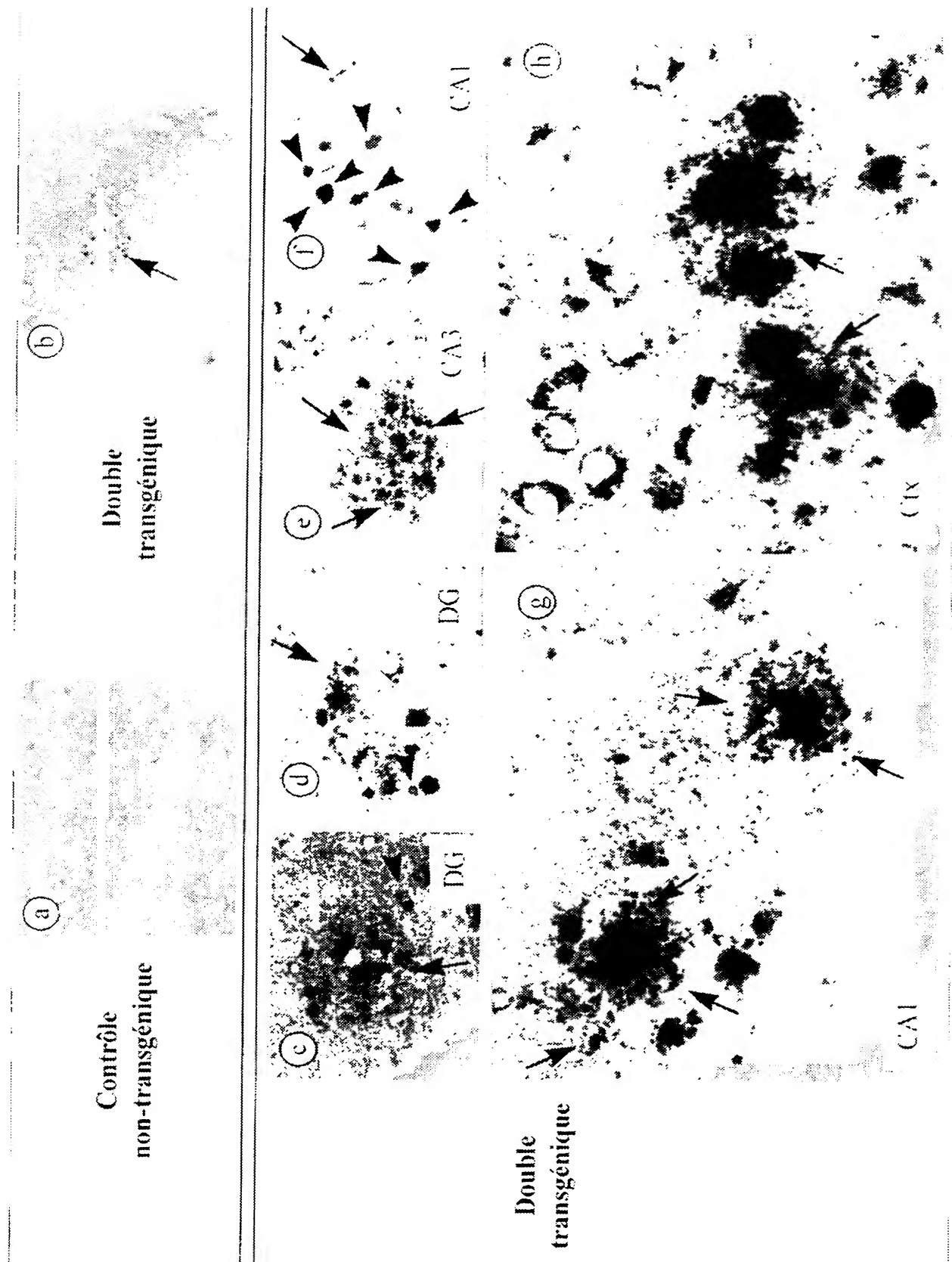


Figure 20A

Anticorps cytochrome C (7H8.2C12)



Anticorps cytochrome C (7H8.2C12) + cytochrome C (cœur de cheval)

cytochrome C
(0.01 mg/ml)



cytochrome C
(0.1 mg/ml)



Anticorps cytochrome C (7H8.2C12) + cytochrome C (cœur de rat)

cytochrome C
(0.01 mg/ml)



cytochrome C
(0.1 mg/ml)



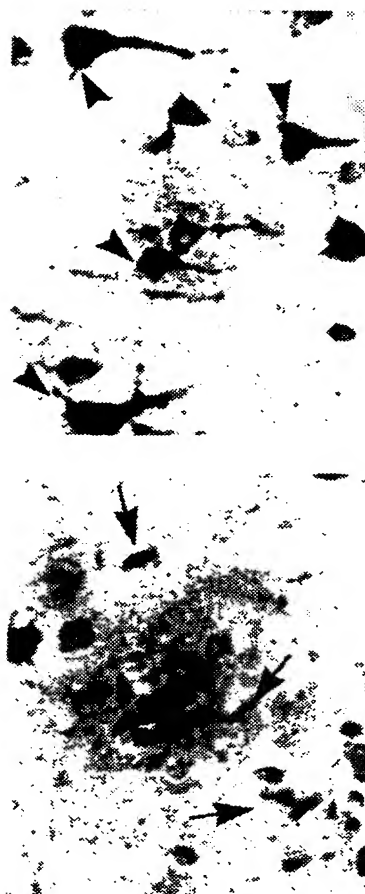
Gyrus denté

CA1

Cortex

Figure 20B

Tissu humain AD

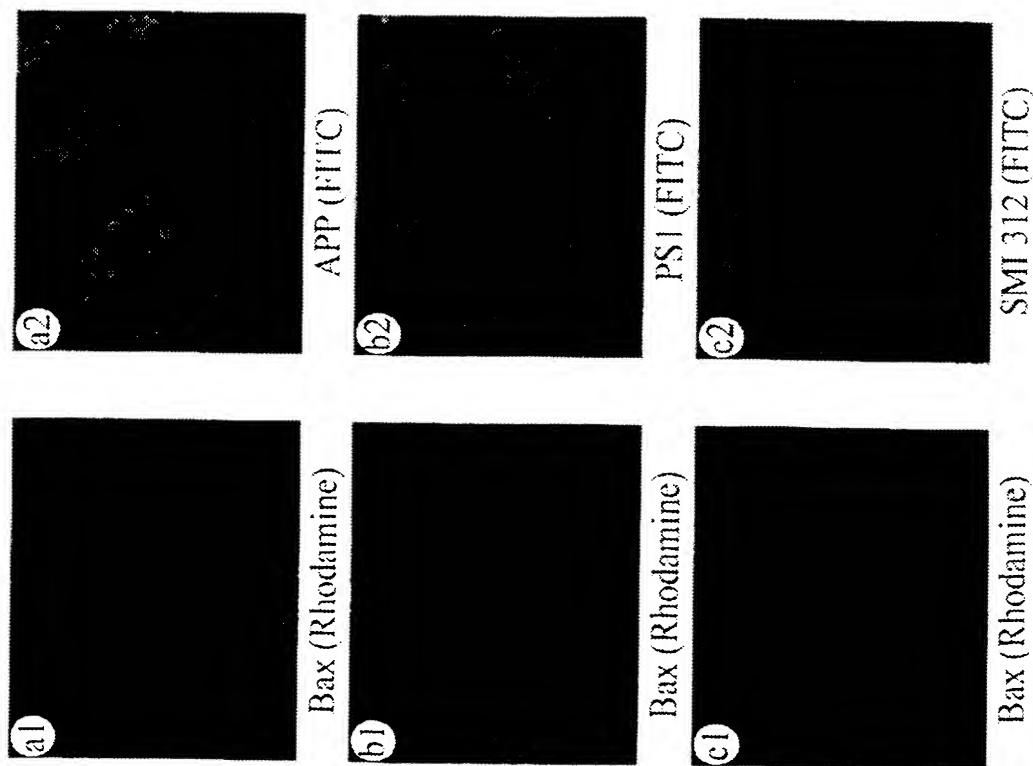


Tissu humain contrôle

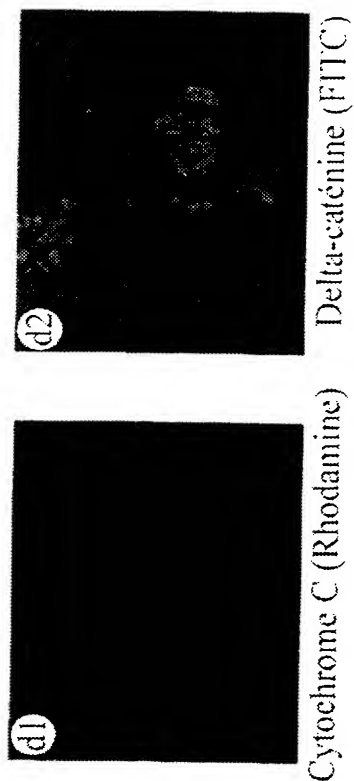


Figure 21

Souris double transgénique
(APP₆₉₅SDL x PS1 M146L)



Souris double transgénique
(APP₆₉₅SDL x PS1 M146L)



Tissu humain AD

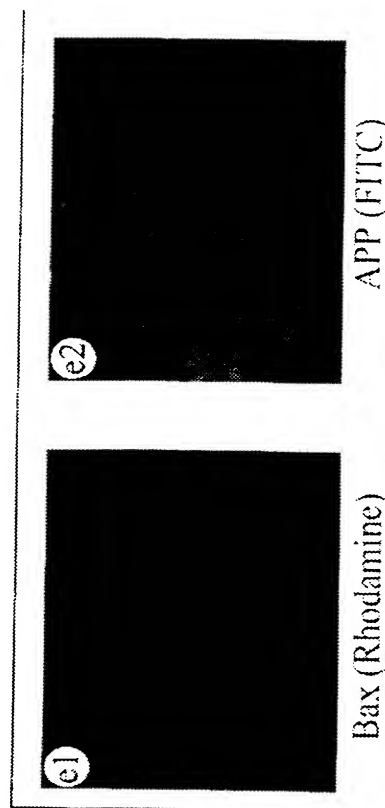


Figure 22

Souris double transgénique
(APP₆₉₅SDL x PS1 M146L)



Bax (CY3)



APP (FITC)



Bax (CY3)



PS1 (FITC)



Bax (CY3)



Cytochrome C (FITC)

Figure 23

